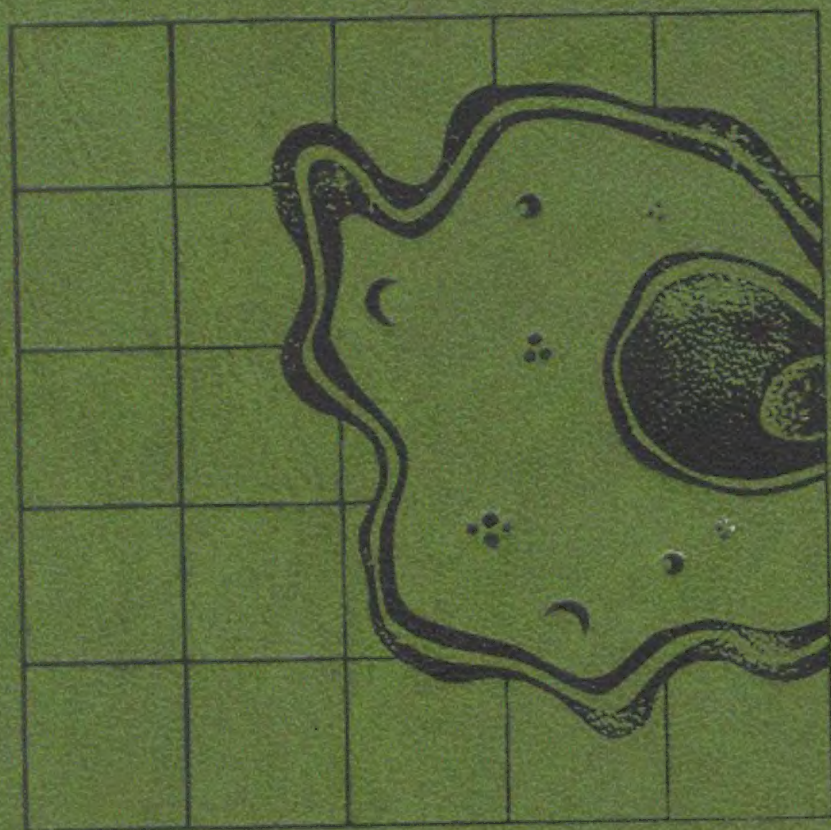


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

НОВЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ



**ANIMAL TISSUE CULTURE
ADVANCES IN TECHNIQUE**

Edited by GERALD D. WASLEY

London Butterworths
1972

**НОВЫЕ МЕТОДЫ
КУЛЬТУРЫ
ЖИВОТНЫХ
ТКАНЕЙ**

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО
канд. биол. наук И. И. Фридлянской

ПОД РЕДАКЦИЕЙ И С ПРЕДИСЛОВИЕМ
проф. Ю. М. Оленова

**ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
МОСКВА 1976**

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Пособие по новым методам культуры тканей. Описаны культуральные среды и практические рекомендации по их использованию; методы стерилизации, культивирование клеток с использованием микротитрационных пластинок; культивирование отдельных типов тканей и клеток, в том числе эмбриональных и т. п. Книга хорошо иллюстрирована многочисленными фотографиями и схемами.

Предназначена для биологов и медиков, пользующихся методом культуры тканей, а также для студентов старших курсов и аспирантов.

Редакция биологической литературы

Предлагаемая книга представляет собой пособие для лиц разных специальностей, использующих в своей работе культуры соматических клеток. Известно, что на этом материале сейчас решаются многие вопросы, имеющие большое теоретическое и практическое значение. Достаточно напомнить о применении клеточных культур в онкологических и вирусологических исследованиях, о быстром развитии новой научной дисциплины — генетики соматических клеток. Однако обсуждение всех этих проблем не входит в задачу книги. Коллектив ее авторов преследует цель помочь в освоении современных методов культивирования клеток тем, кто занимается этим важным и нелегким делом. Нелегким потому, что даже кажущиеся порой несущественными нарушения рекомендуемых приемов могут серьезно отразиться на результатах исследования. В соответствии с этим во всех разделах книги авторы со скрупулезной точностью описывают каждый этап приводимой ими методики.

За последние годы на русском языке не было подобной книги. Здесь освещены почти все важнейшие вопросы, связанные с использованием культуральных сред, хранением клеток при низкой температуре и с применением различных методик стерилизации; рассмотрены проблемы, возникающие при использовании методов культуры тканей в диагностике вирусных инфекций и при исследовании кариотипов. Весьма полезен раздел о культивировании клеток в пластиковых чашках. Этот метод приобретает сейчас все большую популярность, однако у нас он еще не получил широкого распространения.

Следует вместе с тем отметить, что главы, написанные разными авторами, несколько различаются по стилю и характеру изложения; изредка встречаются и повторения. К сожалению, в книге нет раздела, посвященного новым методам дифференцированной окраски хромосом. Несмотря на это, представляется очевидным, что и в таком виде книга будет полезна всем, кому приходится использовать культуры животных клеток.

Ю. М. Оленов

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА АНГЛИЙСКОГО ИЗДАНИЯ

Успехи в культивировании клеток и применение клеточных культур в различных областях биологии возможны лишь при наличии первоклассной техники, и другие критерии здесь не применимы. Однако хорошее знание теории само по себе не создает хороших культур. Я полагаю, что только мастерство, приобретенное с практикой, и симпатия к предмету исследования дают удовлетворительные результаты.

Задача этой книги состоит в том, чтобы обобщить все те новшества, которые появились за последнее время и сейчас широко используются при культивировании клеток. Можно надеяться, что эта информация будет иметь практическое значение для научных работников, применяющих клеточные культуры в своей исследовательской работе.

В заключение мне хотелось бы выразить благодарность всем лицам, принявшим участие в составлении этого сборника и оказавшим помощь и содействие при подготовке его к печати.

Хочу выразить также свою признательность различным организациям, любезно предоставившим фотографии и иллюстрации для этой книги.

Дж. Уосли

Глава 1

СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А. ВИТАКЕР

Department of Virology, Wellcome Research
Laboratories, Beckenham, Kent

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

При составлении питательных сред для клеточных культур приходится решать две трудно совместимые задачи. С одной стороны, необходимо воспроизвести среду, максимально сходную со средой, в которой клетки существуют *in vivo*; с другой стороны, чтобы создать контролируемые стандартные условия, необходимо знать точный состав среды. Естественные среды (полостные жидкости, тканевые экстракты и т. д.) позволяют решить только первую задачу; в средах же, приготовленных из очищенных и охарактеризованных компонентов, лишь в очень незначительной степени воспроизводятся естественные условия.

Эти задачи легко разрешаются при кратковременном культивировании, когда основную роль играют такие факторы, как осмотическое давление, концентрация ионов водорода и других неорганических ионов, характер углевода и состав атмосферы. Растворы, в которых эти факторы сочетаются в определенной комбинации, называются сбалансированными солевыми растворами. Осмотическое давление в нормальной клетке млекопитающих при 38°C составляет примерно 7,6 атм, что соответствует снижению точки замерзания примерно на 0,63°C. Изменения осмотического давления в пределах $\pm 10\%$ или даже более значительные (если эти изменения происходят медленно) почти не влияют на состояние клеток, и все же давление следует поддерживать на нормальном уровне. Осмотическое давление в клетках животных и в большинстве сред для культивирования определяется главным образом содержанием хлористого

натрия. Определенную роль играют также другие неорганические ионы и глюкоза. Высокомолекулярные соединения относительно менее важны. Поэтому, если исходить из необходимости поддержания стабильного осмотического давления, то при создании сред легче изменять концентрацию белка, чем концентрацию низкомолекулярных соединений, таких, как глюкоза.

Концентрация ионов водорода в среде должна быть близкой к нейтральной, хотя большинство тканей выдерживает значительные отклонения от pH 7,0. Оптимальная величина pH для нормального роста составляет 7,2—7,4, и при культивировании некоторых клеток, например линий диплоидных клеток человека, эту величину нельзя превышать. Большинство других тканей, вероятно, не выживает при pH ниже 6,8 и выше 7,6.

Величина pH в культуральной среде контролируется буферной системой, моделирующей естественную буферную систему крови (CO_2 /бикарбонат). Бикарбонат добавляется к среде как часть сбалансированного солевого раствора, в состав которого обычно входит слабый фосфатный буфер. Эта система работает вполне удовлетворительно и используется в течение многих лет в большинстве культуральных сред; тем не менее она имеет ряд недостатков. При хранении и использовании среды CO_2 быстро улетучивается, что приводит к увеличению pH. В закрытых культуральных сосудах количество образующихся в результате дыхания клеток CO_2 и кислых метаболитов оказывается достаточным для поддержания нужной величины pH. В первичных культурах, однако, величина pH может значительно увеличиваться. Этого можно избежать, либо продувая CO_2 перед использованием среды, либо инкубируя культуры в открытых сосудах в термостатах, атмосфера которых обогащена CO_2 .

Кроме того величина pK_a бикарбоната натрия составляет 6,1, что не вполне соответствует физиологическому значению. Все эти недостатки заставили искать новые нетоксичные и нелетучие буферные системы. Одно время использовали глицилглицин [1] и трис-(оксиметил)аминометан [2]. Однако Мартин [3] позже отметил, что доводить pH трис-буферов до нужной вели-

ны лучше с помощью HCl, а не с помощью более токсичных лимонной или малеиновой кислот. При добавлении этого буфера к химически простой и определенной среде он наблюдал хороший рост клеток. Тем не менее некоторые авторы считают, что при длительном культивировании и глицилглициновый, и трис-буферы токсичны. По мнению Шипмана [4], 4-(2-окситил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (ОЭПЭС) имеет значительные преимущества перед ними. ОЭПЭС не токсична во всех проверенных системах, не связывается с металлами, легко растворима при 0 °C. Различные клетки хорошо растут в ее присутствии, и она не влияет на последующее титрование вируса или гемагглютинацию. В 1963 г. Лейбович [5] предложил среду, которая используется при свободном газообмене с воздухом. Вместо бикарбоната натрия в эту среду добавляют основные аминокислоты в свободном состоянии, такие, например, как L-аргинин, L-цистеин и L-гистидин, а образование кислоты снижают, заменяя более окисленные углеводы глюкозой.

К неорганическим ионам, необходимым для выживания, относятся натрий, кальций, магний, железо, а также карбонат-, фосфат- и сульфат-ионы. Их роль еще не совсем понятна, хотя известно, что они необходимы для поддержания осмотического давления, прикрепления клеток к поверхности стекла, для активности ферментов. Наиболее распространенным углеводом является глюкоза, которая входит в состав большинства сбалансированных солевых растворов. Некоторые более сложные среды, кроме глюкозы или вместо нее, содержат другие сахара или более простые соединения, такие, как молочная, пировиноградная и уксусная кислоты. Весьма существенны для выживания клеток кислород и двуокись углерода. В большинстве случаев количество растворенного в среде кислорода оказывается достаточным, но следует отметить, что в закрытых сосудах для обеспечения нужной концентрации кислорода в среде необходимо определенное отношение объема воздуха к объему среды. Двуокись углерода образуется в процессе метаболизма, поэтому потерю ее из среды и потребность в ней установить трудно. Однако имеются достаточные

основания полагать, что для некоторых клеток она абсолютно необходима.

Для длительного поддержания и роста клеток состав среды должен быть более сложным. В сбалансированных солевых растворах клетки сохраняют жизнеспособность в течение относительно короткого периода, но этот период можно значительно увеличить, если добавить в среду сыворотку, желатину, альбумин или метилцеллюлозу [6]. Однако для полного развития потенций клеток и их нормального функционирования необходимо присутствие в среде многих разнообразных компонентов. Среди них наиболее важное значение имеют аминокислоты. Культивируемые клетки млекопитающих, кроме десяти незаменимых аминокислот (аргинина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, треонина, триптофана и валина), нуждаются также в цистине и тирозине [7]. У большинства клеток, особенно трансформированных, резко выражена потребность в глутамине [8]. Перечисленные аминокислоты составляют тот минимум, который необходим для роста клеток; большинство же клеток лучше растет при добавлении других аминокислот. Например, потребности единичных клеток шире, чем потребности клеточных популяций. Локарт и Игл [9] обнаружили, что в среду для роста единичных клеток необходимо включать некоторые другие аминокислоты, например серин. Клетки используют только L-изомеры аминокислот. Присутствие избытка D-изомеров незаменимых аминокислот не дает эффекта. Однако D-изомеры некоторых заменимых аминокислот могут быть ингибиторами [10]. Клетки, зараженные микоплазмой, имеют необычно высокую потребность в аргинине [11], и, возможно, именно этим объясняется относительно высокая концентрация аргинина в некоторых средах.

По-видимому, большинство наиболее важных витаминов принадлежит к группе В. К их числу относятся *p*-аминобензойная кислота, биотин, холин, фолиевая кислота, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, пиридоксаль, рибофлавин, тиамин и инозитол. Как известно, большинство из них входит в состав коферментов, участвующих в обмене, поэтому некоторые среды со-

держат также коферменты. Среды, в которые не добавляют сыворотку, часто содержат еще и жирорастворимые витамины. Другая важная группа веществ, входящих в состав сложных питательных сред, — это восстановители: глутатион, аскорбиновая кислота и L-цистеин. Широко распространенными компонентами сред определенного состава являются предшественники нуклеиновых кислот, поскольку синтезировать нуклеиновые кислоты из простых молекул клеткам труднее. О роли сыворотки в среде пока еще нет единого мнения. Ясно, однако, что все многочисленные попытки создать бесывороточную среду не привели к положительным результатам: лишь немногие клетки способны расти в отсутствие сыворотки. И даже в том случае, когда удается получить растущую культуру клеток в среде без сыворотки, рост этих клеток значительно усиливается при ее добавлении.

И наконец, еще одна группа компонентов, входящих в состав сред, — антибиотики, которые в метаболизме клеток не участвуют. Во всех средах для культивирования клеток хорошо растут попадающие туда микроорганизмы. Использование антибиотиков предохраняет среды от заражения микроорганизмами. Собственно говоря, нет никаких определенных противопоказаний к применению антибиотиков, однако следует ясно представлять возможные нежелательные последствия этого. Во-первых, антибиотики могут лишь подавить развитие микроорганизмов, а не убить их, в результате чего постоянное применение антибиотиков создаст ложное представление о стерильности. Поэтому время от времени необходимо прекращать добавление антибиотиков в среду с тем, чтобы обнаружить возможную замаскированную инфекцию. Во-вторых, следует помнить, что некоторые антибиотики в эффективных концентрациях токсичны, а некоторые, например микостатин и пенициллин, относительно не стабильны и могут разрушаться, став неэффективными, до того, как закончится эксперимент.

Наиболее широкое применение находят антибиотики пенициллин и стрептомицин, хотя вместо последнего лучше пользоваться дигидрострептомицином, поскольку

он также эффективен, но менее токсичен при тех же концентрациях [12]. Томкинс и Фергюсон [13] предлагают использовать следующие антибиотики: канамицин, неомицин, фунгизон, хлорамфеникол, виомицин и полимиксин В. Эти антибиотики эффективно действуют на большинство микроорганизмов, попадающих в клеточные культуры.

Более сложная проблема — борьба с микоплазмами, поскольку их труднее обнаружить и от них труднее избавиться. Для обработки культур, зараженных микоплазмой, используют миокризин, который слегка токсичен, и тилозинтарtrat [14], который стабилен при $+4^{\circ}\text{C}$ и может быть использован в концентрациях до 100 мкг/мл. Однако даже эти соединения, а также тетрациклин скорее подавляют, а не уничтожают микроорганизмы, поэтому их следует применять лишь в случае крайней необходимости.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Появление в продаже разнообразных проверенных сред, приготовленных из высококачественных реактивов, избавило исследователей от многих трудностей, связанных с приготовлением питательных сред для клеточных культур. Тот, кто хочет сам проводить эту работу, может пользоваться руководствами [15—17], в которых подробно описаны методы приготовления сложных сред из концентратов совместимых компонентов и получения различных естественных ингредиентов из материала живых организмов. Мы же не намерены касаться этих вопросов и рассмотрим только те проблемы, которые связаны со средами, поступающими в продажу.

Остановимся на некоторых проблемах, относящихся к использованию жидких сред. Обычно их выпускают готовыми к употреблению, либо как десятикратные концентраты. Неконцентрированная среда, как правило, содержит все компоненты и перед использованием ее в качестве ростовой среды в нее необходимо добавить только сыворотку. Так как эти среды обычно содержат антибиотики, их нужно использовать довольно быстро, поэтому при длительных исследованиях приходится

употреблять различные партии. Одна партия может несколько отличаться от другой, вследствие чего нельзя гарантировать точного воспроизведения условий в каждом последующем эксперименте. То же самое можно сказать и о концентрациях сред, но, так как антибиотики и бикарбонат обычно не входят в их состав, такими средами можно пользоваться дольше. Сложные среды определенного состава включают ряд соединений, например глутамин, которые относительно нестабильны в растворе. Эти соединения более стойки при низких температурах, поэтому среду следует хранить при $+4^{\circ}\text{C}$ или, если срок хранения достаточно продолжителен, при -20°C .

По мере усовершенствования техники культивирования клеток увеличивалась потребность в стандартизованных средах. Первые попытки культивировать в европейских лабораториях линию клеток WI-38, полученную Хейфликом [18], натолкнулись на значительные трудности, обусловленные главным образом различной чистотой компонентов и разными рецептами приготовления сред. Из-за ограничений при хранении жидких сред все большее внимание привлекают среды, изготавливаемые в виде сухих порошков [19—21]. В настоящее время сухие среды можно получить на разных предприятиях. Готовят их либо с помощью шаровых мельниц, либо методом распыления или замораживания-высушивания. Эти среды поддерживают рост клеточных культур не хуже традиционно приготовленных сред. Вместе с тем они обладают рядом преимуществ: стоимость их невелика, они стабильны и содержат однородные компоненты, что достигается оптовой покупкой тщательно отобранных ингредиентов, причем расходы на перевозки при этом сокращаются. Сухие среды рекомендуют хранить при $+4^{\circ}\text{C}$, однако они стабильны долгое время и при комнатной температуре, поэтому их можно пересылать на далекие расстояния. Длительное хранение сред, приготовленных с помощью шаровых мельниц, приводит к неравномерному распределению компонентных частиц. Поэтому лучше покупать среды в количествах, необходимых для месячного или недельного пользования. Некоторые фирмы присылают пробы партий сухих сред,

поэтому можно проверить их пригодность, прежде чем заказывать большие количества.

Одной из наиболее ответственных стадий в приготовлении сред является стерилизация. Термостабильные среды стерилизуют автоклавированием. Этот метод дешев и при соблюдении условий очень эффективен. В результате автоклавирования среда может несколько измениться, но эти изменения не всегда вызывают нежелательный эффект. По данным Сарджента и Смита [22], при совместном автоклавировании глюкозы и фосфатов образуется соединение, которое стимулирует рост и прикрепление эпителиальных клеток к стеклу. Было также обнаружено [23], что качества ростовой среды ухудшаются, если ее стерилизуют фильтрованием, а не автоклавированием. В том случае, когда среда состоит из лабильных компонентов (а к таким средам относится большинство сред полностью или частично химически определенного состава), эффективная стерилизация обычно достигается фильтрованием. Однако было показано [24], что среда Игла при включении в нее сукцинатного буфера становится термостабильной при pH 4—4,5. Перед употреблением в автоклавированные среды нужно добавлять растворы глутамина и бикарбоната.

Большинство методов стерилизации фильтрованием имеет свои проблемы. Некоторое время широко применялись керамические свечи, но при этом отмечалось нарушение роста клеток, что, по-видимому, обусловлено либо избирательной адсорбцией компонентов из среды, либо каталитической активностью поверхности пор свечи. Недостатком фильтров Зейца является наличие в асбестовых прокладках токсических веществ, которые экстрагируются при прохождении среды [25]. Большинство исследователей наилучшим методом стерилизации считают фильтрование через мембранные фильтры, однако некоторые мембранные фильтры пропитывают детергентом, который способствует смачиванию и стерилизации, но может оказаться токсичным для клеток. Тем не менее и асбестовые прокладки, и мембранные фильтры можно предельно тщательно промыть, удалив при этом токсичные вещества. Не следует пользоваться хромированными аппаратами, так как при про-

хождении кислых фильтратов из лежащих ниже слоев может высвободиться медь, образуя токсичный продукт.

В настоящее время для обогащения питательных сред используются разнообразные сыворотки. Обычно их выпускают либо нативными, либо инактивированными нагреванием при 56 °C в течение 30 мин. Тепловая инактивация разрушает комплемент и некоторые случайно попавшие в среду вирусы, что очень облегчает проведение вирусологических исследований. Обработанная таким способом сыворотка, возможно, несколько снижает способность клеток к росту, но хорошо хранится при +4 °C. Непрогретая сыворотка менее стабильна, и ее следует хранить при —20 °C. Замороженные среды и компоненты сред нужно хранить в специальных сосудах; эти сосуды не следует заполнять целиком, так как при замерзании жидкость расширяется.

Предприятия, выпускающие среды, проверяют их на способность обеспечивать рост и на токсичность. Однако единой методики проверки до сих пор еще не разработано. Сравнительно легко проверить среды, предназначенные для роста первичных культур. В этом случае используются клетки, чувствительные к качеству питательной среды; показателями служат их рост и морфология, причем особое внимание следует обращать на появление признаков токсического действия среды. Труднее испытывать пригодность среды для длительного культивирования клеток. Существуют две возможности: проверка эффективности клонирования и испытание в последовательных пересевах. Тест на относительную эффективность клонирования выявляет даже небольшие различия в качестве сред, но имеются данные [27] о том, что высокая эффективность клонирования на среде не обязательно коррелирует с ее способностью хорошо обеспечивать рост. В связи с этим возникают некоторые сомнения в ценности метода клонирования для определения пригодности среды. Испытание среды в последовательных пересевах занимает много времени, но, поскольку это испытание проводится в тех же условиях, в которых обычно используется среда, результаты его надежнее. Считается, что если среда способна поддер-

живать рост клеток по крайней мере в течение шести пересевов и лишь затем наблюдаются ограничения в числе пересевов, то эти ограничения обусловлены свойствами самих клеток, а не среды. Следовательно, чтобы убедиться в пригодности среды для продолжительного культивирования клеточных линий, ее необходимо проверить не менее чем в течение шести пересевов.

СБАЛАНСИРОВАННЫЕ СОЛЕВЫЕ РАСТВОРЫ

Все сбалансированные солевые растворы являются производными физиологического раствора, разработанного Рингером [28]. В состав раствора Рингера входят три катиона — кальций, калий и натрий — в таких же пропорциях, в каких они содержатся в морской воде или в крови высших животных. Первым сбалансированным солевым раствором, специально предназначенным для клеток млекопитающих, был раствор Тироде [29]. Недостаток этого раствора состоит в том, что при его приготовлении следует соблюдать особую осторожность, чтобы избежать выпадения в осадок кальция. С тех пор появился целый ряд рецептов приготовления сбалансированных солевых растворов. Ни один из них не имеет особых преимуществ для роста клеток: при разработке этих рецептов ставилась задача улучшить буферные свойства или не допустить образования осадка. В настоящее время наиболее широко используются растворы Эрла [30] и Хэнкса [31]. Раствор Эрла обладает свойствами сильного буфера благодаря высокой концентрации бикарбоната натрия. Раствор Хэнкса составлен таким образом, что он уравнивается воздухом, а не CO_2 . Этим раствором рекомендуют пользоваться в тех случаях, когда для клеток, которые культивируют, бикарбонат токсичен. Солевой фосфатный буфер Дульбекко и Фогта [32] употребляется для орошения и промывания клеток и как основа для раствора трипсина. Составы упомянутых выше сбалансированных солевых растворов приведены в табл. 1.1. Более подробные сведения о приготовлении солевых растворов и рецепты реже используемых растворов можно найти в обзоре Стьюарта и Кирка [33].

Таблица 1.1
Состав сбалансированных солевых растворов (г/л)

Растворы	Феноловый красный	NaCl	KCl	CaCl_2 (безводный)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	Глюкоза	NaHCO_3
Рингера	—	9,00	0,42	0,25	—	—	—	—	—	—	—
Тироде	—	8,00	0,20	0,20	0,10	—	—	0,05	—	1,00	1,00
Эрла	0,02	6,80	0,40	0,20	—	0,20	—	0,14	—	1,00	2,20
Хэнкса	0,02	8,00	0,40	0,14	—	0,20	0,06	—	0,06	1,00	0,35
Дульбекко и Фогта	0,02	8,00	0,20	0,10	0,10	—	1,42	—	0,20	—	—

РОСТОВЫЕ СРЕДЫ

ЕСТЕСТВЕННАЯ СРЕДА

За исключением сыворотки, естественные среды редко поступают в продажу. Вероятно, этим и объясняется тот факт, что в настоящее время их мало используют, хотя еще недавно они применялись достаточно широко. Так, для роста клеток зародыша человека Малхерб [34] использовал среду, состоящую из аллантоисной или амниотической жидкости (90%), нормальной лошадиной сыворотки (5%) и бычьего эмбрионального экстракта (5%). Жордан [35] культивировал клетки, взятые из полости носа человека на среде, в состав которой входили гомологичная сыворотка крови человека (35%), экстракт куриного эмбриона (5%) и раствор Хэнкса (60%). В тех случаях, когда первичные клеточные культуры получают из небольших кусочков ткани, до сих пор пользуются методом заключения клеток в плазменные сгустки, т. е. коагулят, образующийся при смешивании куриной плазмы и куриного эмбрионального экстракта. Для этой цели получают свежую или высушенную замораживанием куриную плазму, которую хранят в силиконизированных пробирках.

Кроме сыворотки, к числу наиболее распространенных природных ингредиентов сред относится гидролизат лактальбумина, получающийся при ферментативном гидролизе белка молока. Ряд фирм производит этот гидролизат для продажи. Среда, предложенная Мельником [37] для культивирования клеток почки обезьяны и состоящая из раствора Эрла, гидролизата лактальбумина и сыворотки, с успехом может быть использована для культивирования первичных культур многих тканей. Следует отметить, что различные партии гидролизата лактальбумина могут различаться по цвету, содержанию аминокислот и питательной ценности. Было отмечено [38], что при использовании некоторых партий клетки хуже растут и даже утрачивают способность прикрепляться к стеклу. Рост клеток сильно зависит от концентрации гидролизата лактальбумина в среде [39], причем при оптимальных концентрациях отмечается резкое усиление роста. Как уже упоминалось ранее [23], на актив-

ность гидролизата лактальбумина влияет способ стерилизации. В ростовые среды часто добавляют другой продукт переваривания белка — триптозно-фосфатный бульон [40]. Его особенно полезно использовать для обогащения сред с частично определенным химическим составом.

СРЕДЫ, СОСТОЯЩИЕ ИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ И ХИМИЧЕСКИ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Хотя естественные среды лишь частично удовлетворяют требованиям, приведенным в самом начале главы, при их применении трудно достичь стандартных условий, предъявляемых современной техникой культивирования. В то же время среды полностью определенного химического состава имеют два больших недостатка. На них может расти небольшое число специально адаптированных к ним клеточных линий, и качество этих сред всегда улучшается при добавлении сыворотки. Сыворотка, следовательно, является компонентом большинства ростовых сред. Созданы среды, в состав которых входят только компоненты, существенно важные для роста клеток, однако в эти среды необходимо добавлять цельную или диализованную сыворотку. Из такого типа сред, вероятно, наиболее широко используется среда Игла [41, 42]. В ее состав входят сбалансированный солевой раствор Эрла, тринадцать аминокислот и семь витаминов, которые, как было обнаружено, необходимы для роста (табл. 1.2). Некоторые клетки растут на среде Игла с добавлением только альбумина или инозитола [43], хотя, как правило, ее употребляют с 5—10% сыворотки.

Для клеточных культур используют сыворотку различного происхождения. Наиболее широко применяется бычья сыворотка, однако в продажу поступает также лошадиная и кроличья сыворотки, сыворотка человека и др. Как правило, чем моложе животное, тем лучше растут клетки на такой сыворотке. Поэтому сыворотка взрослого рогатого скота хуже сыворотки теленка, лучшей же считается сыворотка эмбриона коровы. Крайне удивительно, что роль сыворотки до сих пор еще пол-

Состав среды Игла (мг/л) (в скобках приведены эквиваленты для аминокислот, выраженные в мМ)

Компоненты среды	Основная среда (1955)	Минимальная среда (МЕМ) (1959)
Аминокислоты		
L-аргинин, гидрохлорид	21 (0,1)	126 (0,6)
L-цистин	12 (0,05)	24 (0,1)
L-глутамин	292 (2,0)	292 (2,0)
L-гистидин, гидрохлорид	9,5 (0,05)	38 (0,2)
L-изолейцин	26 (0,2)	52 (0,4)
L-лейцин	26 (0,2)	52 (0,4)
L-лизин, гидрохлорид	36 (0,2)	72 (0,4)
L-метионин	7,5 (0,05)	15 (0,1)
L-фенилаланин	18 (0,1)	32 (0,2)
L-треонин	24 (0,2)	48 (0,4)
L-триптофан	4 (0,02)	10 (0,05)
L-тирозин	18 (0,1)	36 (0,2)
L-валин	24 (0,2)	48 (0,4)
Витамины		
Холинхлорид	1	1
Фолиевая кислота	1	1
Инозитол	2 ¹⁾	2
Никотинамид	1	1
Пантотенат кальция	1	1
Пиридоксаль, гидрохлорид	1	1
Рибофлавин	0,1	0,1
Тиамин	1	1
Соли (сбалансированный солевой раствор Эрла)		
NaCl	6800	6800
KCl	400	400
CaCl ₂	200	200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	200
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	150	150
NaHCO ₃	2000	2000
Глюкоза	1000	1000

В состав среды часто добавляют биотин в количестве 1,0 мг/л.

1) Является частым компонентом поступающих в продажу сред, хотя и не включен в пропись, первоначально предложенную Иглом.

ностью не выяснена, хотя она и является очень важным компонентом сред для культивирования клеток. Высказываемые по этому поводу мнения противоречивы. Кажется весьма вероятным, что важную роль играют низкомолекулярные питательные вещества, связанные или адсорбированные сывороточными белками. В результате диализа способность сыворотки обеспечивать рост клеток может исчезнуть [42, 44, 45], однако она восстанавливается при добавлении протеозного пептона (0,1%) [46]. Эта способность не восстанавливается при добавлении витаминов, предшественников нуклеиновых кислот или аминокислот. Следовательно, активным началом в данном случае служат пептиды, что и было подтверждено в дальнейшем Пизом и др. [47]. Однако имеются указания, что аминокислоты, адсорбированные белками, все-таки играют какую-то роль, поскольку, как было обнаружено, при добавлении больших количеств сыворотки к среде, которая во всех других отношениях оказывается дефицитной, концентрация аминокислот становится достаточной для достижения порогового уровня выживаемости [48]. Полагают, что липиды составляют еще одну группу низкомолекулярных соединений, весьма важных для роста клеток [49—51].

По некоторым данным, высокомолекулярные фракции сыворотки также играют важную роль в питании клеток [52]. К таким фракциям относят альбумин [53] и α - и β -глобулины [54—56]. Однако по крайней мере одна группа исследователей считает, что сывороточные белки не распадаются и не включаются в клетки [57]. По-видимому, роль высокомолекулярных соединений совсем иная. Возможно, они выполняют защитную функцию, предохраняя клетки от механических повреждений [56, 58, 59] или действуя как детоксицирующие агенты [60]. Норкин и др. [51] показали, что альбумин в среде проявляет наибольшую эффективность в том случае, когда из среды экстрагирована большая часть связанных с ним низкомолекулярных соединений. Освободившиеся после экстрагирования участки связывания в молекуле альбумина могут присоединять токсические вещества, находящиеся в среде. Помимо всего сказанного выше, сыворотка способствует также прикреплению клеток к

субстрату, в частности к стеклу [56, 61, 62], и распластыванию по нему. Это, вероятно, обусловлено изменением заряда на поверхности стекла [63, 64]. Фракция, вызывающая это изменение, не известна, но почти наверняка имеет отношение к α -глобулинам [65]. Активным началом ее считают гликопротеид фетуин, однако обнаружен и другой белок [67], неидентичный фетуину. Не так давно Уоллис и др. [68] была высказана мысль, что роль сыворотки в среде сводится к торможению действия протеолитических ферментов. Эти авторы считают, что сыворотка необходима для инактивации трипсина, остающегося после ферментной дезагрегации клеток, а также протеаз, синтезируемых клетками. Уоллис и др. предположили, что так называемая токсическая сыворотка просто содержит мало или вовсе не содержит такого антиферментного компонента и что «инактивация» снижает его концентрацию, а следовательно, и «ростоснижает» его концентрацию. Какую же из этих разнообразных функций на самом деле выполняет сыворотка, а также значение каждой из них предстоит еще выяснить. Чрезвычайно сложный состав сыворотки крайне затрудняет такое исследование, но пока оно не будет выполнено, все попытки найти эффективные заменители этого природного компонента сред не могут увенчаться успехом.

СРЕДЫ С ОПРЕДЕЛЕННЫМ СОСТАВОМ

Основываясь на приведенных выше данных о роли сыворотки в среде, можно по-разному подойти к решению проблемы замены сыворотки в среде. Исходя из предположения о роли сыворотки как защитного агента, Катзута и др. [58] предложили использовать в качестве заменителей альгиновую кислоту, декстран и поливинилпирролидон (ПВП). Они получили штамм клеток HeLa, адаптированный к росту в среде, состоящей из сбалансированного солевого раствора, 0,1% ПВП (средний молекулярный вес $7 \cdot 10^5$), гидролизата лактальбумина (0,4%) и дрожжевого экстракта (0,8%) [59]. Используют также [49, 69, 70] очищенные белки, например инсулин, иногда с добавлением инертных полимеров. Неко-

торые исследователи [49, 70] добавляют в среду источники липидов, причем показано [49], что метиловые эфиры ненасыщенных жирных кислот с длинной цепью стимулируют рост, тогда как насыщенные жирные кислоты с длинной цепью и жирные кислоты с разветвленной цепью такой способностью не обладают. В течение нескольких лет Микл [71] изучал свойства фракции сыворотки, влияющей на распластывание клеток. Он обнаружил, что ее можно заменить карбамилфосфатом, который при добавлении к синтетической среде хорошо замещает цельную сыворотку, особенно в присутствии инсулина. Среда F-10 (табл. 1.3), предложенная Хэмом [73], предназначена для выращивания клеток при добавлении очищенных белков. Оптимальная концентрация всех компонентов этой среды установлена экспериментально. Среда F-10 используется либо с сывороточным альбумином или фетуином, либо с низкими концентрациями сыворотки.

В течение ряда лет многие цитобиологи стремились создать для культивирования клеток среды химически определенного состава, в которую не нужно было бы добавлять белки. Еще в 1911 г. Льюис М. и Льюис У. [74] пытались решить эту проблему, обнаружив, что глюкоза, аминокислоты и пептиды, добавленные в солевые растворы, увеличивают время выживания тканей куриного зародыша. Современные попытки решить эту проблему относятся к созданию в 1950 г. среды 199 [75] (табл. 1.4). Среда 199 содержит почти все аминокислоты, витамины, некоторые предшественники нуклеиновых кислот, дополнительные факторы роста, источники липидов и раствор Эрла, в который входит также азотнокислое железо. Эта чрезвычайно сложная среда по-прежнему широко используется как поддерживающая среда, а при добавлении сыворотки — как ростовая среда. При полном отсутствии сыворотки, однако, жизнеспособность клеток на ней охраняется относительно недолго.

Позднее среду 199 модифицировали [76], и она получила название среда 858. Эта среда была значительно эффективнее среды 199. Благодаря увеличенному содержанию восстановителей (гидрохлористого L-цистеина,

Таблица 1.3

Состав среды Хэма F-10 (мг/л)
(в скобках приведены эквиваленты
для аминокислот, выраженные в мМ)

Аминокислоты	
L-аланин	8,91 (0,1)
L-аргинин, гидрохлорид	211,00 (1,0)
L-аспарагиновая кислота	13,30 (0,1)
L-аспарагин, гидрохлорид	15,00 (0,1)
L-цистеин, гидрохлорид	31,50 (0,2)
L-глутаминовая кислота	14,70 (0,1)
L-глутамин	146,20 (0,1)
Глицин	7,51 (0,1)
L-гистидин, гидрохлорид	21,00 (0,1)
L-изолейцин	2,60 (0,02)
L-лейцин	13,10 (0,1)
L-лизин, гидрохлорид	29,30 (0,1)
L-метионин	4,48 (0,03)
L-фенилаланин	4,96 (0,03)
L-пролин	11,50 (0,1)
L-серин	10,50 (0,1)
L-треонин	3,57 (0,03)
L-триптофан	0,60 (0,003)
L-тирозин	1,81 (0,01)
L-валин	3,50 (0,03)
Витамины	
Биотин	0,02
Пантотенат кальция	0,71
Холинхлорид	0,69
Фолиевая кислота	1,32
Инозитол	0,54
Никотинамид	0,61
Пиридоксин, гидрохлорид	0,20
Рибофлавин	0,37
Тиамин, гидрохлорид	1,01
Витамин B ₁₂	1,36
Предшественники нуклеиновых кислот	
Гипоксантин	4,08
Тимидин	0,73
Источники липидов	
Липоевая кислота	0,20
Источники углеводов (кроме глюкозы)	
Пируват натрия	110,0
Соли	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,52
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,004

(продолжение табл. 1.3)

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
NaCl	7400,00
KCl	285,00
Na ₂ HPO ₄	153,60
KH ₂ PO ₄	83,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	152,80
CaCl ₂	33,30
NaHCO ₃	1200,00
Глюкоза	1100,00

аскорбиновой кислоты и глутатиона) слишком высокий окислительный потенциал, характерный для среды 199, в среде 858 приближается к физиологическому уровню. Пять витаминов группы В: тиамин, рибофлавин, ниацин, ниацинамид и пантотенат — исключены из ее состава, поскольку они являются составными частями шести добавляемых коферментов. Через два года среду 858 видоизменили в среду CMRL-1066 [77]. Четыре жирорастворимых витамина: А, D, К, Е — были заменены пятью упомянутыми выше витаминами группы В. Эта среда — результат семилетних поисков, сотен составленных экспериментальных сред; она способна обеспечить рост постоянных клеточных линий в отсутствие сыворотки. Позднее Вэймаут [78] предложила среду с более простым составом. Ее среда 752/1 (табл. 1.5) сейчас широко используется.

В течение ряда лет в лаборатории д-ра Эрла в Бетесде разрабатывали различные варианты среды химически определенного состава. Одна из них, среда NCTC 109 (табл. 1.6) [79], поддерживает рост ряда линий нормальных и злокачественных клеток, выделенных от различных видов (мышь, человек, хомячок, обезьяна и др.). Эта среда значительно упрощена за счет того, что из ее состава исключены почти половина используемых в других средах витаминов, все коферменты, восстановители и источники липидов [80]. Многие клеточные линии растут на этой упрощенной среде, но иногда необходимо добавлять к ней инозитол и реже витамин B₁₂.

В табл. 1.7 сравниваются среды химически определенного состава, о которых говорилось выше. Многие из

Таблица 1.4

Состав среды 199 (мг/л)
(в скобках приведены эквиваленты
для аминокислот, выраженные в мМ)

Аминокислоты	25,0 (0,30)
L-аланин ¹	70,0 (0,40)
L-аргинин, гидрохлорид	30,0 (0,25)
L-аспарагиновая кислота ¹	20,0 (0,75)
L-цистин	75,0 (1,00)
L-глутаминовая кислота ¹	100,0 (0,07)
L-глутамин	50,0 (0,70)
Глицин	20,0 (0,10)
L-гистидин, гидрохлорид	10,0 (0,75)
L-оксипролин	20,0 (0,15)
L-изолейцин ¹	60,0 (0,45)
L-лейцин ¹	70,0 (0,20)
L-лизин	15,0 (0,20)
L-метионин ¹	25,0 (0,15)
L-фенилаланин ¹	40,0 (0,35)
L-пролин	25,0 (0,25)
L-серин ¹	30,0 (0,25)
L-треонин ¹	10,0 (0,005)
L-триптофан ¹	40,0 (0,20)
L-тирозин	25,0 (0,20)
L-валин ¹	
Витамины	0,05
<i>п</i> -Аминобензойная кислота	0,01
Биотин	0,01
Пантотенат кальция	0,5
Холинхлорид	0,01
Фолиевая кислота	0,05
Инозитол	0,025
Ниацин	0,025
Никотинамид	0,025
Пиридоксаль, гидрохлорид	0,025
Пиридоксин, гидрохлорид	0,01
Рибофлавин	0,01
Тиамин, гидрохлорид	0,10
Витамин А	0,10
Витамин D	0,01
Витамин E	0,01
Витамин K	
Коферменты	10,0
АТФ	
Восстановители	0,05
Аскорбиновая кислота	0,1
L-цистеин, гидрохлорид	0,05
Глутатион	

¹ В первоначальной прописи двойные количества DL-аминс-кислот.

(продолжение табл. 1.4)

Предшественники нуклеиновых кислот	
Аденин	10,0
Гуанин	0,3
Гипоксантин	0,3
Тимин	0,3
Урацил	0,3
Ксантин	0,3
Адениловая кислота	0,2
Источники липидов	
Холестерин	0,2
Твин 80	5,0
Источники углеводов (кроме глюкозы)	
2-дезоксид-Д-рибоза	0,5
Д-рибоза	0,5
Ацетат натрия	50,0
Соли	
NaCl	6800,0
KCl	400,0
CaCl ₂	200,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄	140,0
NaHCO ₃	2200,0
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1
Глюкоза	1000,0

этих сред чрезвычайно сложны и число компонентов в них варьирует от 72 до 41. Таким образом, примерно через пятьдесят девять лет после первых работ Льюис М. и Льюиса У. [74] удалось добиться роста клеток в среде с точно известным химическим составом. Тщательность приготовления и хранения сред, а также степень очистки реактивов имеют очень большое значение для культивирования клеток.

ПОДДЕРЖИВАЮЩИЕ СРЕДЫ

Эти среды предназначены главным образом для сохранения клеточных культур в хорошем состоянии в течение нескольких недель, так чтобы свойства клеток,

Таблица 1.5

Состав среды Вэймаут 752/1 (мг/л)
(в скобках приведены эквиваленты
для аминокислот, выраженные в мМ)

Аминокислоты	
L-аргинин, гидрохлорид	75,0 (3,6)
L-аспарагиновая кислота	60,0 (4,6)
L-цистин	15,0 (0,06)
L-глутаминовая кислота	150,0 (10,2)
L-глутамин	350,0 (23,8)
Глицин	50,0 (6,6)
L-гистидин	150,0 (8,0)
L-изолейцин	25,0 (1,9)
L-лейцин	50,0 (3,8)
L-лизин	240,0 (14,2)
L-метионин	50,0 (3,4)
L-фенилаланин	50,0 (3,0)
L-пролин	50,0 (4,4)
L-треонин	75,0 (6,4)
L-триптофан	40,0 (2,0)
L-тирозин	40,0 (2,2)
L-валин	65,0 (5,5)
Витамины	
Биотин	0,02
Холинхлорид	250,0
Пантотенат кальция	1,0
Фолиевая кислота	0,4
Инозитол	1,0
Никотинамид	1,0
Пиридоксин, гидрохлорид	1,0
Рибофлавин	10,0
Тиамин, гидрохлорид	0,2
Витамины B ₁₂	
Восстановители	
Аскорбиновая кислота	17,5
L-цистеин, гидрохлорид	90,0
Глутатион	15,0
Предшественники нуклеиновых кислот	
Гипоксантин	25,0
Соли	
NaCl	6000,0
KCl	150,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	120,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	240,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
Na ₂ HPO ₄	300,0
KH ₂ PO ₄	80,0
NaHCO ₃	2240,0
Глюкоза	5000

Таблица 1.6

Состав среды NCTC 109 (мг/л)
(в скобках приведены эквиваленты
для аминокислот, выраженные в мМ)

Аминокислоты	
L-аланин	31,48 (3,5)
L-α-амино-н-масляная кислота	5,51 (0,5)
L-аргинин, гидрохлорид	31,00 (1,5)
L-аспарагин	8,09 (0,6)
L-аспарагиновая кислота	9,91 (0,7)
L-цистин	10,49 (0,4)
L-глюкозамин	3,20 (0,2)
L-глутаминовая кислота	8,26 (0,5)
L-глутамин	135,73 (9,3)
Глицин	13,51 (1,8)
L-гистидин	19,73 (1,3)
L-оксипролин	4,09 (0,3)
L-изолейцин	18,04 (1,4)
L-лейцин	20,44 (1,6)
L-лизин	30,75 (2,1)
L-метионин	4,44 (0,3)
L-орнитин	7,38 (0,6)
L-фенилаланин	16,53 (1,0)
L-пролин	6,13 (0,5)
L-серин	10,75 (1,0)
L-таурин	4,18 (0,3)
L-треонин	18,93 (1,6)
L-триптофан	17,50 (0,9)
L-тирозин	16,44 (0,9)
L-валин	25,00 (2,1)
Витамины	
л-Аминобензойная кислота	0,125
Биотин	0,025
Пантотенат кальция	0,025
Холинхлорид	1,25
Фолиевая кислота	0,025
Инозитол	0,125
Ниацин	0,0625
Никотинамид	0,0625
Пиридоксаль, гидрохлорид	0,0625
Пиридоксин, гидрохлорид	0,0625
Рибофлавин	0,025
Тиамин, гидрохлорид	0,025
Витамин А	0,025
Витамин D	0,25
Витамин E	0,025
Витамин K	0,25
Витамин B ₁₂	10,00

(продолжение табл. 1.6)

Коферменты	
НАД	7,0
НАДФ	1,0
Кофермент А	2,5
Кокарбоксилаза	1,0
Флавинадениндинуклеотид	1,0
УТФ	1,0
Восстановители	
Аскорбиновая кислота	49,9
L-цистени, гидрохлорид	259,9
Глутатион	10,1
Предшественники нуклеиновых кислот	
Дезоксиаденозин	10,0
Дезоксицитидин	10,0
Дезоксигуанозин, гидрохлорид	10,0
Тимидин	10,0
5-метилцитозин	0,1
Источники липидов	
Твин 80	22,5
Источники углеводов (кроме глюкозы)	
Глюкуронолактон	1,8
Na-глюкуронат · H ₂ O	1,8
Ацетат натрия · 3H ₂ O	50,0
Соли	
NaCl	6800,0
KCl	400,0
CaCl ₂	200,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200,0
Na ₂ HPO ₄	140,0
NaHCO ₃	2200,0
Глюкоза	1000,0

подлежащие изучению, оставались неизменными. Рост, вызывающий отрыв клеточного пласта от стекла или затрудняющий микроскопическое исследование, должен быть максимально заторможен, однако чувствительность к вирусам должна сохраняться [81]. Во многих случаях для этого достаточно просто уменьшить концентрацию сыворотки или вовсе изъять ее из состава среды.

Таблица 1.7

Сравнение некоторых сред химически определенного состава

[illegible]

Сыворотка имеет тот недостаток, что способствует росту клеток или содержит ингибиторы вирусов [82]. Почти все среды определенного состава, описанные выше, не способны обеспечить рост подавляющего большинства клеток в отсутствие сыворотки; именно поэтому они служат превосходными поддерживающими средами. В качестве такой среды для первичных культур при приготовлении вирусной вакцины широко используется среда 199. Некоторые среды были созданы специально для поддержания культур тканей. Большинство из них составлено таким образом, чтобы избежать добавления сыворотки, и включает желатину [83] или снятое молоко [84]. Одной из наиболее эффективных является среда, предложенная Смитом [81], в которой содержится ультрафильтрат переваренной печеночной ткани.

Сохранность клеток зависит не только от выбора подходящей среды. Имеются данные, что способность к длительному выживанию определяется на ранних этапах культивирования, причем на длительность выживания клеток оказывают влияние как методы диспергирования, так и условия роста. К тому времени, когда в культуре образуется сплошной слой клеток, увеличить период выживания клеток, уже определенный в период роста, практически невозможно.

ВЫБОР СРЕДЫ

Каталоги многих фирм, выпускающих среды для культивирования клеток, содержат большое разнообразие наименований сред. Однако только в нескольких случаях имеются указания к их применению. Многие среды были специально разработаны для определенных клеточных линий или клеточных типов, но, как правило, их можно использовать для самых различных культур. Постоянные клеточные линии часто приспособлены к росту на определенной среде, и если в ней не содержится компонентов, которые бы отрицательно сказались на результатах предполагаемого исследования, то именно эту среду и следует выбрать для работы. Для посева первичной культуры или выведения новой постоянной клеточной линии выбрать какую-то одну среду из многочисленных существующих сред довольно трудно.

Многие первичные культуры достаточно хорошо растут на простой и дешевой среде, в состав которой входит гидролизат лактальбумина и сыворотка (10%). Использование среды 199 и ее производных позволяет уменьшать концентрацию сыворотки в среде, рост же клеток при этом не нарушается. Превосходной средой для первичных культур и клеточных линий является среда Хэма F-10 с 2—10% сыворотки [73]. Более поздняя модификация этой среды, среда F-12, служит для клонирования клеток. Для культивирования клеточных линий наиболее широко используется среда Игла. Наименее простой ее вариант, основная среда, пригоден для многих диплоидных культур, хотя количество аминокислот в этой среде иногда может быть лимитирующим фактором [86]. По этой причине часто предпочитают использовать среду с удвоенной концентрацией аминокислот и витаминов [87]. Выпускают также среду Игла с утроенным содержанием аминокислот. Минимальная среда Игла (MEM) [42] обычно используется для постоянных клеточных линий, хотя в некоторых случаях количество аргинина и гистидина оказывается слишком высоким. При работе с «капризными» клеточными культурами, а также первичными культурами, культурами лейкоцитов и клеток, взятых из биопсийного материала рекомендуется пользоваться средой Маккоя 5а [88], хотя в последнем случае многие исследователи предпочитают среду RPMI 1640 [89].

Представляется удивительным, как легко клетки млекопитающих сохраняют жизнеспособность и растут на таких разнообразных средах. Вместе с тем иногда трудно адаптировать клетки к росту на близких по составу средах или даже на разных партиях одной и той же среды. Иногда причина кроется в недостаточно точном описании среды при первой публикации. В некоторых прописях не указывается, какие, гидратированные или безводные, соли были использованы, в какой форме, L или DL, были добавлены аминокислоты. Таким образом, можно приготовить две партии одной и той же среды, и они будут различаться по своей токсичности и другим свойствам. Следовательно, при описании сложных по составу сред чрезвычайно важно очень точно указывать

все свойства каждого компонента и указывать источники их получения. Только при соблюдении этих условий можно добиться стандартизации и только тогда можно будет сравнивать результаты, полученные в различных лабораториях.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Gomori G., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **62**, 33 (1946).
2. Swim H. E., Parker R. F., Science, N. Y., **122**, 466 (1955).
3. Martin G. M., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **116**, 167 (1964).
4. Shipman C. Jr., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **130**, 305 (1969).
5. Leibovitz A., Am. J. Hyg., **78**, 173 (1963).
6. Phillips H. J., Andrews R. V., Expl Cell Res., **16**, 678 (1959).
7. Eagle H., J. biol. Chem., **214**, 839 (1955).
8. Chang R. S., J. exp. Med., **113**, 405 (1961).
9. Lockart R. Z. Jr., Eagle H., Science, N. Y., **129**, 252 (1959).
10. Best N. H., Mills S., Leach K. K., Durham N. N., Leach F. R., Expl Cell Res., **31**, 13 (1963).
11. Schimke R. T., Barile M. F., J. Bact., **86**, 195 (1963).
12. Moskowitz M., Kelker N. E., Science, N. Y., **141**, 647 (1963).
13. Tomkins G. A., Ferguson J., Aust. J. exp. Biol. med. Sci., **43**, 743 (1965).
14. Gross G. F., Goodman M. R., Shaw E. J., Aust. J. exp. Biol. med. Sci., **45**, 201 (1967).
15. Parker R. C., Methods of Tissue Culture, 3rd edn. Pitman Medical, London, 1961.
16. Paul J. Cell and Tissue Culture, 4th edn. Livingstone, Edinburgh, 1970.
17. Penso G., Balducci D., Tissue Cultures in Biological Research, Elsevier, Amsterdam, 1963.
18. Hayflick L., Moorhead P. S., Expl Cell Res., **25**, 585 (1961).
19. Swim H. E., Parker R. F., J. Lab. clin. Med., **52**, 309 (1958).
20. Hayflick L., Jacobs P., Perkins F., Nature, Lond., **204**, 146 (1964).
21. Green A. E., Silver R. K., Krug M. D., Coriell L. L., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **118**, 122 (1965).
22. Sargeant T. P., Smith S., Science, N. Y., **131**, 606 (1960).
23. Whitaker A. M., Br. J. exp. Path., **50**, 347 (1969).
24. Yamane I., Matsuya Y., Jimbo K., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **127**, 335 (1968).
25. House W., Nature, Lond., **201**, 1242 (1964).
26. Cahn R. D., Science, N. Y., **155**, 195 (1967).
27. Moorhead P. S., Personal communication.
28. Ringer S., J. Physiol. Lond., **18**, 425 (1895).
29. Tyrode M. V., Archs Int. Pharmacodyn. Ther., **22**, 205 (1910).
30. Earle W. R., Arch. exp. Zellforsch., **16**, 116 (1934).
31. Hanks J. H., J. cell. comp. Physiol., **31**, 235 (1948).
32. Dulbecco R., Gogt M., J. exp. Med., **99**, 167 (1954).
33. Stewart D. C., Kirk P. L., Biol. Rev., **29**, 119 (1954).

34. Malherbe H., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **86**, 124 (1954).
35. Jordan W. S. JR., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **92**, 867 (1956).
36. Carrel A., J. Exp. Med., **38**, 407 (1923).
37. Melnick J. L., Ann. N. Y. Acad. Sci., **61**, (4), 754 (1955).
38. Takaoka T., Katsuta H., Kaneko K., Kawana M., Furukawa T., Jap. J. exp. Med., **30**, 393 (1960).
39. Floss D. R., Expl Cell Res., **34**, 603 (1964).
40. Ginsberg H. S., Gold E., Jordan W. S. JR., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **89**, 66 (1955).
41. Eagle H., Science, N. Y., **122**, 501 (1955).
42. Eagle H., Science N. Y., **130**, 432 (1959).
43. Chang R. S., Geyer R. P., J. Immun., **79**, 455 (1957).
44. Eagle H., Proc. natn. Acad. Sci. USA, **46**, 427 (1960).
45. Metzgar D. P. JR., Moskowitz M., Science, N. Y., **130**, 1421 (1959).
46. Harris M., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **102**, 468 (1959).
47. Piez K. A., Oyama V. I., Levintow L., Eagle H., Nature Lond., **188**, 59 (1960).
48. Dupree L. T., Sandford K. K., Westfall B. H., Covallesky A. B., Expl Cell Res., **28**, 381 (1962).
49. Tytell A. A., Neuman R. E., Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol., **19**, 385 (1960).
50. Ham R. G., Science, N. Y., **140**, 802 (1963).
51. Norkin S. A., Szernobilsky B., Griffith E., Dubin I. N., Archs Path., **80**, 273 (1965).
52. Francis M. D., Winnick T., J. biol. Chem., **202**, 273 (1953).
53. Tozer B. T., Pirt S. J., Nature, Lond., **201**, 375 (1964).
54. Kent H. N., Gey G. O., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **94**, 205 (1957).
55. Kent H. N., Gey G. O., Science, N. Y., **131**, 666 (1960).
56. Holmes R., Wolfe S. W., J. biophys. biochem. Cytol., **10**, 389 (1961).
57. King D. W., Bensch K. G., Hill R. B. JR., Science, N. Y., **131**, 106 (1960).
58. Katsuta H., Takaoka T., Hosaka S., Hibino M., Otsuki I., Hattori K., Suzuki S., Mitamura K., Jap., J. exp. Med., **29**, 45 (1959).
59. Katsuta H., Takaoka T., Furukawa T., Kawana M., Jap., J. exp. Med., **30**, 147 (1960).
60. Moskowitz M., Schenck D. M., Amborski G., Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol., **22**, 383 (1963).
61. Lieberman I., Ove P., J. biol. Chem., **233**, 637 (1958).
62. Nordling S., Saxen E., Penttinen K., Acta path. Microbiol. scand., **63**, 28 (1965).
63. Rappaport C., Bishop C. B., Expl Cell Res., **20**, 580 (1960).
64. Nordling S., Penttinen K., Saxen E., Expl Cell Res., **37**, 161 (1965).
65. Weiss L., Expl Cell Res., **17**, 499 (1959).
66. Fisher H. W., Puck T. T., Sato G., Proc. natn Acad. Sci. USA, **44**, 4 (1958).
67. Lieberman I., Ove P., J. biol. Chem., **234**, 2754 (1959).
68. Wallis C., Ver B., Melnick J. L., Expl Cell Res., **58**, 271 (1969).
69. Nagle S. C. JR., Tribble H. R. JR., Anderson R. E., Gary N. D., Proc. Soc. exp. Biol. Med., **112**, 340 (1963).
70. Higuchi K., J. infect. Dis., **112**, 213 (1963).
71. Michl J., Expl Cell Res., **23**, 324 (1961).

72. *Michl J.*, Nature, Lond., 207, 412 (1965).
73. *Ham R. G.*, Expl Cell Res., 29, 515 (1963).
74. *Lewis M. R., Lewis W. H.*, Anat. Rec., 5, 277 (1911).
75. *Morgan J. F., Morton H. J., Parker R. C.*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 73, 1 (1950).
76. *Healy G. M., Fisher D. C., Parker R. C.*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 89, 71 (1955).
77. *Parker R. C., Castor L. N., McCulloch E. A.*, Spec. Publish. N. Y. Acad. Sci., 5, 303 (1957).
78. *Waymouth C.*, J. natn Cancer Inst., 22, 1003 (1959).
79. *Evans V. J., Bryant J. C., Fioramonti M. C., McQuilkin W. T., Sanford K. K., Earle W. R.*, Cancer Res., 16, 77 (1956).
80. *Evans V. J., Bryant J. C., Kerr H. A., Schilling E. L.*, Expl Cell Res., 36, 439 (1964).
81. *Smith S. E.*, Br. J. exp. Path., 42, 232 (1961).
82. *Tomlinson A. J. H., Davies J. R., Madigan E. M.*, Mon. Bull. Minist. Hlth., 23, 116 (1964).
83. *Friedman M., Lieberman N. M.*, Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol., 15, 587 (1956).
84. *Baron S., Low R. J.*, Science N. Y., 128, 89 (1958).
85. *Ham R. G.*, Proc. natn. Acad. Sci. USA., 53, 288 (1965).
86. *Griffiths J. B., Pirt S. J.*, Proc. R. Soc., 168, 421 (1967).
87. *Macpherson I., Stoker M.*, Virology, 16, 147 (1962).
88. *McCoy T. A., Maxwell M., Kruse P. F.*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 100, 115 (1959).
89. *Moore G. E., Gerner R. E., Franklin H. A.*, J. Am. med. Ass., 199, 87 (1967).

Глава 2

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ФИЛЬТРОВАНИЕМ

Дж. МУЛЬВАНИ

Millipore (U. K.) Ltd., Heron House, Wembley, Middlesex

ВВЕДЕНИЕ

Фильтрация — один из процессов, о котором люди знали и которым пользовались для практических целей еще на заре развития цивилизации; об этом говорят дошедшие до нас с тех пор письменные свидетельства. В течение многих веков человек создавал хитроумные приспособления для фильтрации, используя в них такие материалы, как песок, глины, древесный уголь, волокна, ткань, растертый каменный уголь, бумагу, войлок и различные порошки. Иногда применяли сосуды, заполненные фильтрующей средой, или (чем пользуются и сейчас) специальные прессы, оборудованные держателями фильтрующего слоя, центрифуги с фильтрующими элементами, вращающиеся барабаны и большие фильтры из слоя зернистого адсорбента.

В современных процессах требования, предъявляемые к качеству фильтрации, широко варьируют. Выбор способа фильтрации определяется природой жидкости, скоростью протекания, уровнем требуемой очистки от частиц и микробов. Стерилизация — это лишь одно из практических приложений процесса фильтрации. Если цель фильтрации — добиться стерильности, то даже 99,995%-ная эффективность не достаточна. В отфильтрованной пробе не должно содержаться ни одного жизнеспособного организма. Для того чтобы достичь этого, необходимо применять такие методы фильтрации, с помощью которых удаляются частицы размером не только в 1 микрон, но и меньше. В связи с этим чрезвычайно важное значение приобретает выбор фильтра, а знание свойств различных фильтрующих

сред, несомненно, окажет в данном случае огромную услугу. На первый взгляд последняя задача может показаться неразрешимой для тех, кто пользуется фильтрованием как одним из вспомогательных методов при выполнении основной работы. На самом деле она не так сложна, как представляется неискушенному взгляду, поскольку огромное число самых разнообразных материалов, используемых для фильтрования, довольно легко разделить на две большие группы, а именно ситовые и глубинные фильтры.

В современной биологии наука о стерилизации фильтрованием имеет фундаментальное значение, поскольку в подавляющем большинстве случаев фильтрование служит единственным способом стерилизации многих жидкостей. Биологические жидкости, в том числе и среды для культивирования тканей, нельзя стерилизовать нагреванием, так как при этом разрушаются наиболее важные компоненты, например сыворотка. По вполне ясным причинам вакцины, а также многие антибиотики необходимо стерилизовать только фильтрованием, поскольку они чувствительны к температуре. Число жидкостей, которые можно стерилизовать только фильтрованием, слишком велико, чтобы мы останавливались на них подробно. Для стерилизации фильтрованием наиболее важное значение имеют: 1) выбор фильтра, 2) система для фильтрования и, наконец, 3) тип предварительной обработки. В этой главе будут подробно рассмотрены все эти три пункта.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ФИЛЬТРУЮЩИХ СРЕД

ГЛУБИННОЕ ФИЛЬТРОВАНИЕ

Глубинные фильтры состоят обычно из волокон, частиц или фрагментов особых материалов, спрессованных или сплетенных вместе, так что они образуют единую массу, в которой имеются извилистые каналы или поры (рис. 2.1). Хотя поры в таких фильтрах можно сделать крупными или мелкими в зависимости от степени компактности или размера волокон, все же они располагаются в случайном порядке и различаются по размеру.

Глубинные фильтры сорбируют частицы или микроорганизмы в матриксе, поскольку размер пор фильтров обычно намного превышает размеры фильтрующихся частиц. Частицы движутся по извилистым порам в глубь фильтра, где они задерживаются в результате физического взаимодействия, под действием силы тяжести и

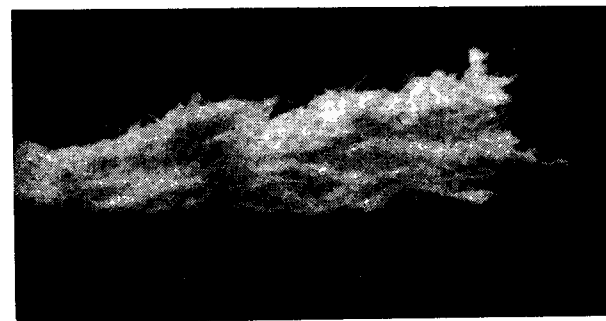


Рис. 2.1. Глубинные фильтры изготавливают, либо спрессовывая или связывая друг с другом частицы, волокна, либо спутывая отрезки какого-нибудь подходящего материала таким образом, чтобы образовались извилистые проходы, в которых задерживаются загрязняющие агенты.

т. д. (рис. 2.2). Способность удерживать частицы обычно контролируют, изменяя плотность фильтра давлением или нагреванием. Иногда для этой цели фильтры пропитывают смолами. Метод спецификации глубинных фильтров произвольный и основывается целиком на экспериментальной проверке. К глубинным фильтрам, которые используют для стерилизации, относятся асбестовые прокладки, фарфоровые свечи, пористое спеченное стекло или нержавеющей сталь, сложные пластины из асбеста, стекла и бумаги. Глубинные фильтры обладают довольно высокой поглотительной способностью, поскольку разные частицы и микроорганизмы накапливаются в их матриксе. Эта способность проявляется либо в довольно продолжительном сроке службы фильтра, либо в возможности очищать сильно загрязненные растворы.

Вместе с тем сама структура таких фильтров накладывает определенные ограничения, когда их применяют для стерилизации. Например, частицы, проходя через фильтр, следуют путем наименьшего сопротивления, пока не прикрепятся или не задержатся в каком-либо месте. При увеличении разности давления, которое мо-

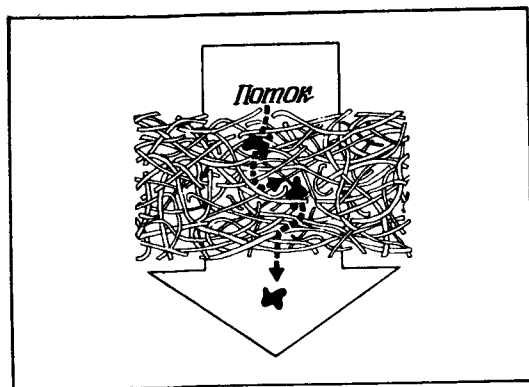


Рис. 2.2. Частицы, которые попадают в глубинный фильтр, задерживаются там, где возникающее сопротивление равно их движущей силе.

Любое последующее увеличение давления заставляет их двигаться глубже, так что иногда они проходят через весь фильтр.

жет произойти в результате засорения фильтра или возрастания рабочего давления, частицы и микроорганизмы передвигаются ниже по матриксу. В конце концов некоторые из них могут пройти через фильтр и попасть в фильтрат. Если частицы проходят через фильтр, то эффективность фильтрования и соответственно качество фильтрата снижаются. Если через фильтр проникают жизнеспособные микроорганизмы, то утрачивается весь смысл стерилизации. По этой причине максимальная разность давления при стерилизации с помощью глубинных фильтров не должна превышать 800—1000 мм рт. ст. Глубинные фильтры обладают номинальной, а не абсолютной производительностью фильтрования, которая

тесно связана с допустимой разностью давления. Такой тип фильтровального материала не удаляет из жидкости все частицы определенного размера; эффективность этих фильтров, которую устанавливают при фильтровании тест-частиц или микроорганизмов какого-то определенного размера, обозначают как 90, 95 и 99%-ная [1].

Некоторые осложнения возникают также в связи с прорастанием микроорганизмов, попавших в матрикс фильтра. При подходящих условиях микроорганизмы размножаются внутри фильтра, проникают дальше в фильтр и в конце концов, оказываясь на нижней стороне фильтра, загрязняют фильтрат. В основном это происходит при длительном фильтровании. В табл. 2.1 указаны типичные скорости протекания различных жидкостей через асбестовые фильтры, которые применяют для стерилизации. Следует отметить, что максимальная разность давления, которая рекомендуется при использовании этих фильтров, должна составлять примерно 800 мм рт. ст.

Таблица 2.1

Скорости протекания через асбестовые фильтры, обычно применяемые для стерилизации (Карлсон — Форд)

Тип фильтра	Средняя плотность	Проницаемость	Средний размер пор	Скорость протекания воды, л·час—1·м—2	Скорость протекания сахарного сиропа, л·час—1·м—2
EKS2	0,352	0,00744	10,0	560	13,0
EKS	0,344	0,00713	13,7	750	17,5
EK	0,322	0,01116	15,4	1100	26,5
S10	0,320	0,01069	18,5	1400	34,0
S9	0,294	0,02433	27,3	2150	53,5

Прежде чем использовать тот или иной глубинный фильтр, очень важно установить, что материал, из которого он сделан, не оказывает вредного химического воздействия на фильтруемую жидкость. В качестве иллюстрации приведем два примера. Как уже упоминалось выше, многие глубинные фильтры пропитаны различными смолами, влияющими на способность частиц задерж-

живаться в фильтре. Во время фильтрования эти смолы могут вымываться раствором из материала фильтра, а некоторые из них токсичны для многих биологических систем. Кроме того, хорошо известно, что глубинные фильтры, предназначенные для стерилизации, эффективно удаляют из фильтруемого раствора очень мелкие частицы. При стерилизации вакцины очень важно удалить из нее все бактерии, но также важно сохранить высокий титр фильтрата; однако это не всегда возможно при пользовании глубинными фильтрами, поскольку значительная часть антигена будет оставаться на матриксе фильтра. Принимая специальные меры, можно уменьшить потерю антигена, но избавиться от потерь полностью нельзя. К серьезным недостаткам всех глубинных фильтров следует отнести подвижность их матрикса. С материала, образующего фильтр, могут слущиваться мельчайшие чешуйки или волокна (особенно при гидравлическом ударе), которые загрязняют фильтрат. Во многих случаях это не имеет особого значения, но если растворы используются для инъекции человеку или животным, нужны специальные меры предосторожности, поскольку эти слущенные фрагменты могут закупорить кровеносные сосуды.

ФИЛЬТРОВАНИЕ ЧЕРЕЗ СИТО

Фильтры-сита коренным образом отличаются от глубинных фильтров. Они характеризуются совершенно одинаковыми, равномерно расположенными отверстиями. Такие фильтры обладают абсолютной эффективностью, так как задерживают все частицы, размер которых превышает размер пор сита. В качестве простейших примеров можно привести перфорированные листы металла или пластика (рис. 2.3). Задержание частиц, определяемое структурой пор, в таких фильтрах целиком происходит на поверхности, поэтому их поглощательная способность ниже, чем глубинных. Поскольку фильтры-сита гомогенны и непрерывны, в них не происходит перемещения материала фильтра. Следовательно, использование фильтров с размером пор, меньшим размера самых мелких известных бактерий, гарантирует

стерилизацию. Специальные технологические приемы позволяют изготавливать сита из различных материалов, таких, например, как нержавеющая сталь, никель, нейлон, полиэфир и т. д. Производят ткань, переплетение нитей в которой образует однородные отверстия (поры) размером около 2 мкм. Конечно, эти сита нельзя использовать для стерилизации, поскольку есть бактерии, размер которых меньше 0,25 мкм.

МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ

В последние годы успешно разрабатывается производство особого типа ситовых фильтров — мембранных фильтров. Размер пор мембранных фильтров варьирует от 10 до 0,025 мкм. Создание и усовершенствование мембранных фильтров сыграло особую важную роль для развития методов стерилизации фильтрованием. Впервые появились сита, размеры пор которых не превышали размеров бактерий и даже вирусов. Мембранные фильтры, выпускаемые фирмой «Миллипоре» (Millipore), представляют собой тонкие пористые листы очищенных эфиров целлюлозы. Размеры пор этих фильтров, а также скорости протекания воды и прохождения воздуха в них указаны в табл. 2.2. Такие фильт-

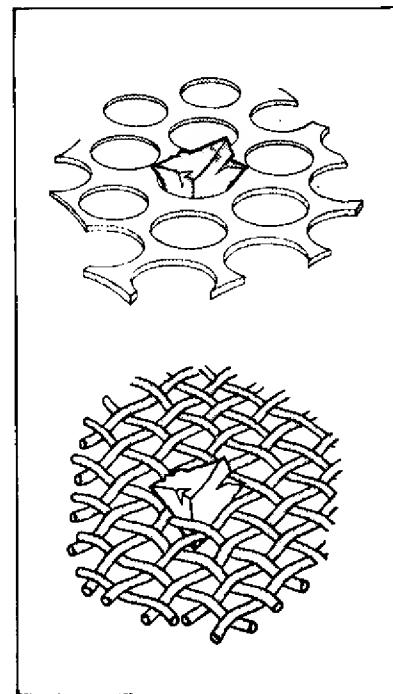


Рис. 2.3. Фильтры-сита обычно состоят из одного слоя металла или пластика, переплетенных нитей ткани или металлической проволоки.

Поры в таких фильтрах однородны и распределены равномерно.

ры изготавливают и из других полимеров (нейлона, поливинилхлорида и PTFE). Пористость таких фильтров очень высока: около 84% их поверхности приходится на долю пор. Скажем для сравнения, что в обычных ситовых фильтрах из переплетенных нитей пустотами занято менее 50% поверхности. Эфиры целлюлозы, которые используются в производстве мембранных фильтров, биологически инертны и при имплантации человеку или животным не вызывают реакций со стороны тканей. Многочисленные и тщательные исследования, проведенные независимо в разных лабораториях, показали, что мембранные фильтры «Миллипор» не воспламеняются и не оказывают токсического действия. Они широко используются для имплантации тканей *in vivo*, а также для цитологических исследований на животных.

Мембранные фильтры, подобно всем другим ситовым фильтрам, задерживают частицы на поверхности, в свя-

Таблица 2.2
Скорость фильтрования воды и воздуха через мембранные фильтры «Миллипор»

Тип фильтра	Средний размер пор, мкм	Скорость фильтрования при 25 °C и 700 мм. рт. ст.	
		воды, мл·мин ⁻¹ ·см ⁻²	воздуха, л·мин ⁻¹ ·см ⁻²
SC	8,0	850	55
SM	5,0	540	35
SS	3,0	400	20
RA	1,2	300	15
AA (черный)	0,8	212	11
DA	0,65	150	10
HA (черный)	0,45	64	4,5
PH	0,30	40	3,7
GS	0,22	21	2,5
VC	0,10	2	0,49
VM	0,05	1	0,31
VF	0,01	0,2	0,22

зи с чем, как уже упоминалось выше, их поглотительная способность ниже, чем глубинных. По этой причине, если фильтруют большие объемы жидкости или сильно загрязненную жидкость, лучше произвести предварительное фильтрование через глубинный фильтр. Свойство поверхностной адсорбции широко используется в аналитических исследованиях. Например, оно позволяет микробиологу-аналитику сконцентрировать все частицы или микроорганизмы, содержащиеся в пробе, на плоской поверхности, где их легко подсчитать, измерить или исследовать с помощью микроскопа. Материал, из которого изготавливают мембранные фильтры, выдерживает разность давления до 5·10⁵ мм рт. ст. Практически пределы допустимого давления определяются не фильтром, а держателем фильтра. Эта характеристика ситовых фильтров выгодно отличает их от глубинных фильтров, для которых разность давления не должна превышать приблизительно 800 мм рт. ст.; при больших давлениях, как уже упоминалось выше, микроорганизмы могут проходить через фильтр.

Мембранные фильтры очень тонкие (около 150 мкм), поэтому в их матриксе задерживается очень мало жидкости. Эта характеристика особенно ценна в тех случаях, когда фильтруемая жидкость дорогостояща или ее очень мало. Опыт показывает, что при фильтровании через фильтры «Миллипор» почти не происходит потерь независимо от того, фильтруется несколько миллилитров или несколько тысяч литров жидкости. Поглощение мембранными фильтрами, как правило, незначительно. Свойства и титр фильтруемой жидкости обычно не меняются. Исключения наблюдаются при работе с вирусными частицами, размер которых составляет 0,1 мкм или больше. При пропускании же вакцины, содержащей мелкие вирусные частицы, такие, как вирусы полиомиелита, титр практически не меняется.

Мембранные фильтры устойчивы к температуре порядка 200 °C, поэтому перед использованием для стерилизации их можно автоклавировать. Способность мембранных фильтров выдерживать высокие давления, а также их чрезвычайно высокая пористость (отсюда низкая сопротивляемость движению жидкости) дают

возможность достичь высокой скорости фильтрации. Фильтрация через мембранный фильтр занимает меньше времени, чем через глубинный фильтр той же площади. В табл. 2.2 приведены скорости фильтрации воды через мембранные фильтры; если сравнить их со скоростью фильтрации через глубинные фильтры (табл. 2.1), то нетрудно заметить, что при одинаковых условиях скорость фильтрации через ситовые фильтры почти в 40 раз выше, чем через глубинные фильтры. Для того чтобы отфильтровать через глубинный фильтр очень вязкий раствор, требуется около двух дней; этот же раствор через мембранный фильтр может быть отфильтрован за несколько часов, причем и размер требуемого мембранного фильтра также значительно меньше. При работе с мембранными фильтрами не возникает проблем, связанных с зарастанием фильтра, потому что через поры фильтров, предназначенных для стерилизации, микроорганизмы не проходят.

При фильтрации сред для культивирования «капризных» клеток лучше использовать максимально гидрофобные MF-фильтры, которые предоставляет фирма «Миллипор» по специальному заказу.

КОНТРОЛЬ ЗА КАЧЕСТВОМ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

Для того чтобы определить, соответствуют ли миллипоровые фильтры требованиям стандарта, их подвергают тщательной проверке. Ниже перечислены специфические тесты, выполняемые систематически:

1. Определение максимального размера пор (проба на образование пузырьков). Этот чрезвычайно важный тест может быть дополнительно осуществлен в лабораторных условиях, поэтому техника проведения пробы на образование пузырьков описана далее подробно.

2. Определение скорости фильтрации.

3. Определение размеров пор с помощью интрузии ртути.

4. Определение бактериального роста — сравнивают бактерии, которые культивируют на поверхности фильтра и на агаре, при этом показателями служат число выживших бактериальных клеток, характер образования колоний и продукция пигмента.

5. Тест на стерильность фильтрации. Например, чтобы определить пригодность фильтров GS (0,22 мкм) для стерилизации, через них пропускают суспензию, содержащую клетки различных видов *Pseudomonas* (минимальный размер этих клеток примерно 0,3 мкм). Параллельно такую же суспензию пропускают через фильтр HA (0,45 мкм). Суспензии фильтруют в стерильные колбы и инкубируют затем в течение 15 дней при температуре 37°C. HA-фильтрат помутнеет, что указывает на рост *Pseudomonas*, а GS-фильтрат должен остаться прозрачным. В противном случае вся партия GS-фильтров не пригодна к использованию.

В специальном исследовании [4], проведенном для определения эффективности стерилизации фильтрованием, было установлено, что единственной системой, надежно обеспечивающей стерильность фильтратов, является система, включающая миллипоровые фильтры и соответствующую аппаратуру. Каждая фильтрующая система оценивалась при пропускании через нее густой бактериальной суспензии *Serratia marcescens*. Параллельно оценивались три другие фильтрующие среды: диатомовая земля (кизельгур), спеченное стекло и асбест. Таким образом, можно видеть, что выбор фильтра для стерилизации фильтрованием имеет первостепенное значение. В настоящее время считается, что только мембранные миллипоровые фильтры гарантируют стерильность во всех условиях; однако благодаря их низкой поглотительной способности для создания надежной и экономичной системы фильтрации часто бывает необходимо использовать также и глубинный предфильтр. В табл. 2.3 приведены данные по химической устойчивости стандартных миллипоровых фильтров MF. Можно видеть, что низкомолекулярные спирты, кетоны и некоторые другие растворители повреждают фильтры, и поэтому они не пригодны для стерилизации биологического материала, в котором присутствуют эти растворители. Фирма «Миллипор» предлагает особые фильтры (Solvinert), которые устойчивы к действию почти всех известных растворителей и других химических агентов (табл. 2.3). Диаметр пор фильтров Solvinert составляет приблизительно 0,25 мкм.

Таблица 2.3

Химическая совместимость миллипоровых фильтров
(статические условия)¹

Химические соединения	Тип фильтра	
	MF	Solvinert
Углеводороды		
Гексан	I	I
Петролейный эфир	I	I
Пентан	I	I
Бензол	I	I
Толуол	I	I
Ксилол	I	I
Галоидзамещенные углеводороды		
Метилхлороформ	I	I
Хлороформ	I	I
Четыреххлористый углерод	I	I
Метиленхлорид	III	II
Этиленхлорид	II	II
Трихлорэтилен	II	I
Перхлорэтилен	I	I
Трихлорэтан	I	I
Другие органические соединения		
Пропиленгликоль	II	I
Этиленгликоль	IV	I
Полиэтиленгликоль	IV	I
Диэтилацетамид	IV	II
Диметилформамид	IV	II
Формальдегид, 37%	II	I
Пиридин	IV	II
Нитробензол	IV	II
Метанол—хлороформ (1 : 1)	II	I
Триэтиламин	III	I
Гексаметилендиамин	IV	I
Анилин	II	I
Масляный альдегид	IV	I
Диметилсульфоксид	IV	II
Тетрагидрофуран	IV	II
Нитропропан	IV	I
Фенол	III	I
Спирты		
Метиловый спирт	IV	I
Этиловый спирт	III	I
н-Пропиловый спирт	II	I
Изопропиловый спирт	II	I
н-Бутиловый спирт	I	I
Изобутиловый спирт	I	I
Глицерин	I	I

(продолжение табл. 2.3)

Химические соединения	Тип фильтра	
	MF	Solvinert
Бензиловый спирт, 0,9%	I	I
Эфирные спирты		
Поливиниловый спирт	I	I
Карбитол	IV	I
Метилцеллозольв	IV	I
Бутилцеллозольв	IV	I
Кетоны		
Ацетон	IV	II
Метилэтилкетон	IV	II
Метилизобутилкетон	IV	II
Циклогексанон	IV	II
Диацетоновый спирт	IV	I
Сложные эфиры		
Метилацетат	IV	I
Этилацетат	IV	II
Бутилацетат	IV	II
Этиловый эфир муравьиной кислоты	IV	II
Метиловый эфир муравьиной кислоты	IV	I
Эфиры		
Диэтиловый эфир	I	I
Изопропиловый эфир	I	I
1,4-диоксан	IV	II
Окись этилена	III	I
Другие растворители		
Минеральные спирты	I	I
Скипидар	I	I
Доуклен WR	II	I
Инхибисол	I	I
Кобен	I	I
Фреон TF или PCA	I	I
Хлоротен NU	II	I
Варсол	I	I
Растворитель Стоддарда	I	I
Криогены		
Жидкий кислород	I	I
Жидкий азот	I	I
Жидкий гелий	I	I
Жидкий водород	I	I
Кислоты		
Ледяная уксусная кислота	IV	I
Уксусная кислота, 10%	I	I
6 н. HCl	I	I

(продолжение табл. 2.3)

Химические соединения	Тип фильтра	
	MF	Solvinert
6 н. H_2SO_4	I	I
6 н. HNO_3	II	I
98 %-ная H_2SO_4 (конц.)	IV	I
36 %-ная HCl (конц.)	IV	I
70 %-ная HNO_3 (конц.)	IV	I
Основания		
6 н. $NaOH$	IV	I
6 н. KOH	IV	I
6 н. NH_4OH	I	I

1 Условия испытания. Фильтр диаметром 47 мм погружали в исследуемую жидкость на 72 ч при 25 °С. Данные этой таблицы могут быть использованы лишь как общие указания. При динамическом фильтровании или при других температурах возможны изменения. Условные обозначения. Для фильтров MF: I—совместимы; растворитель не оказывает химического действия на фильтр; II—совместимы, фильтры незначительно набухают или скручиваются, но пригодны для очистки и стерилизации жидкости; III—непригодны, слабая химическая реакция; IV—несовместимы, так как фильтр растворяется или разрушается. Для фильтров Solvinert: I—совместимы, менее 15% линейного набухания; II—совместимы, 15—25% линейного набухания.

ВЫБОР СИСТЕМЫ ФИЛЬТРОВАНИЯ

Для стерилизации фильтрованием рекомендуют пользоваться фильтром GS (0,22 мкм). Известно, что эти фильтры удаляют все бактерии из раствора. Однако создание системы фильтрования не заканчивается выбором самого фильтра и держателя фильтра. Часто бывает необходимо предварительное фильтрование, поэтому нужно подобрать соответствующий глубинный фильтр. Следующий этап — объединение компонентов в систему. Существуют 2 типа систем: одни из них работают под давлением, другие — под вакуумом. Мы рекомендуем системы, работающие под давлением, поскольку они имеют неоспоримые преимущества, которые перечислены ниже:

1. Скорость фильтрования под давлением выше, а следовательно, процесс этот занимает меньше времени. Предел разности давлений для вакуумной системы составляет всего лишь одну атмосферу. Поскольку эффек-

тивность мембранных фильтров не зависит от разности давлений, возможность применения высокой разности давлений, несомненно, выгодна для ускорения фильтрования.

2. Так как система находится под давлением, любая утечка происходит наружу, что уменьшает вероятность заражения. К серьезным недостаткам вакуумной системы фильтрования следует отнести возможность попадания извне микроорганизмов в том случае, если между сосудом, в который собирается фильтрат, и окружающей средой есть хотя бы небольшой зазор.

3. Не требуется промежуточного резервуара. Фильтрат собирают в сосуды, в которых его можно хранить. Таким образом отпадает проблема стерильной разливки фильтрата из контейнера, в котором создавался вакуум.

4. Исключается возможность заражения в результате обратного тока воздуха через вакуумный насос. Показано, что это случается довольно часто, когда небольшие лабораторные вакуумные насосы используют попеременно для создания вакуума и давления.

5. При фильтровании под вакуумом белковые растворы сильно вспениваются, что, вероятно, приводит к денатурации белка. Этого не происходит при фильтровании под давлением.

6. Под давлением становится возможным фильтровать растворители с низкой точкой кипения. В вакуумной системе такие растворы быстро испаряются из резервуара.

7. Система фильтрования под давлением упрощает проведение теста на образование пузырьков при проверке качества фильтра (стр. 54).

Наиболее широко используемые системы для стерилизации фильтрованием схематически показаны на рис. 2.4 и 2.5. На рис. 2.4 показан сосуд из нержавеющей стали, который находится под давлением; этот сосуд служит резервуаром фильтруемой жидкости. Давление в сосуде создается при помощи сжатого азота или воздуха. Под действием этого давления жидкость перемещается, проходит через фильтрующий элемент и собирается в стерильной приемной колбе с отводным филь-

ром, через который выходит вытесняемый воздух. Система в действии показана на рис. 2.6. Эта система предназначена для фильтрования небольших количеств жид-

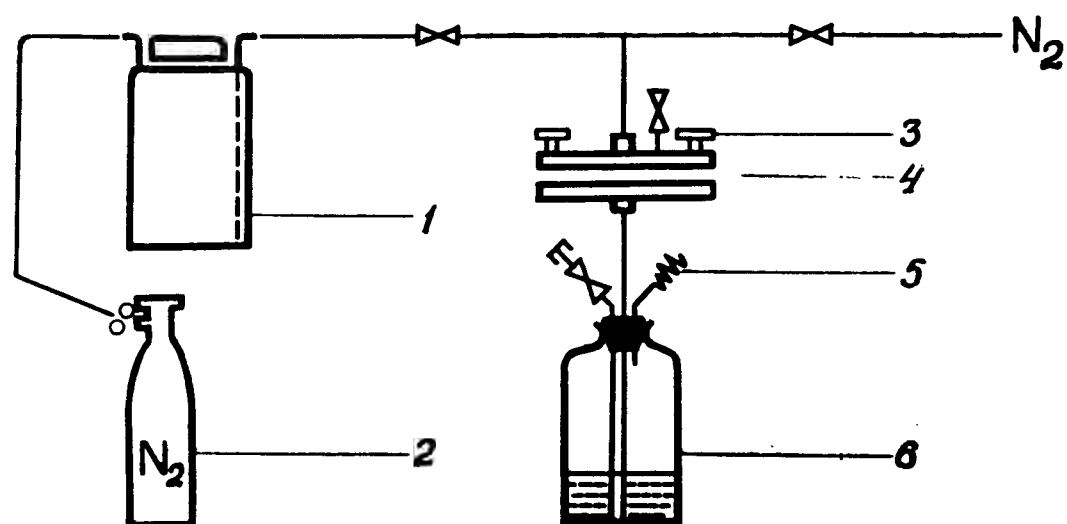


Рис. 2.4. Простейшая система, которая используется для стерилизации фильтрованием небольших объемов жидкости.

1 — сосуд из нержавеющей стали, в котором поддерживается высокое давление; 2 — газ, не содержащий паров масла; 3 — выпускной клапан; 4 — держатель фильтра; 5 — выпускной фильтр; 6 — стерильный приемный сосуд.

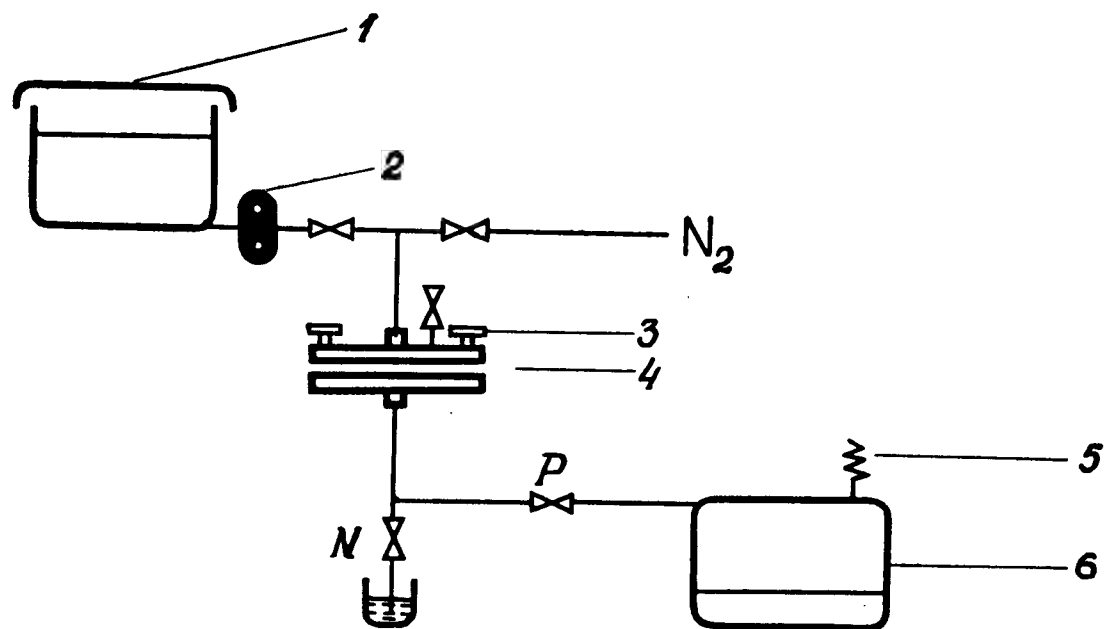


Рис. 2.5. Система, позволяющая проводить тест на образование пузырьков в химическом стакане (если в приемном сосуде фильтруемая жидкость не видна).

1 — резервуар для фильтруемой жидкости; 2 — насос; 3 — выпускной клапан; 4 — держатель фильтра; 5 — выпускной фильтр; 6 — стерильный приемный сосуд.

кости. На рис. 2.5 схематически изображена система для фильтрования больших объемов жидкости. Фильтруемая жидкость из загрузочной емкости подается насосом через фильтровальный элемент в стерильный резервуар, который имеет стерилизующий отводный фильтр для вы-

теснения и наполнения воздуха при заполнении и опустошении сосуда соответственно. Это типичная система, которая применяется в фармацевтической промышленности при стерилизации препаратов для инъекций. Она используется также при стерилизации больших объемов питательных сред для культивирования тканей или

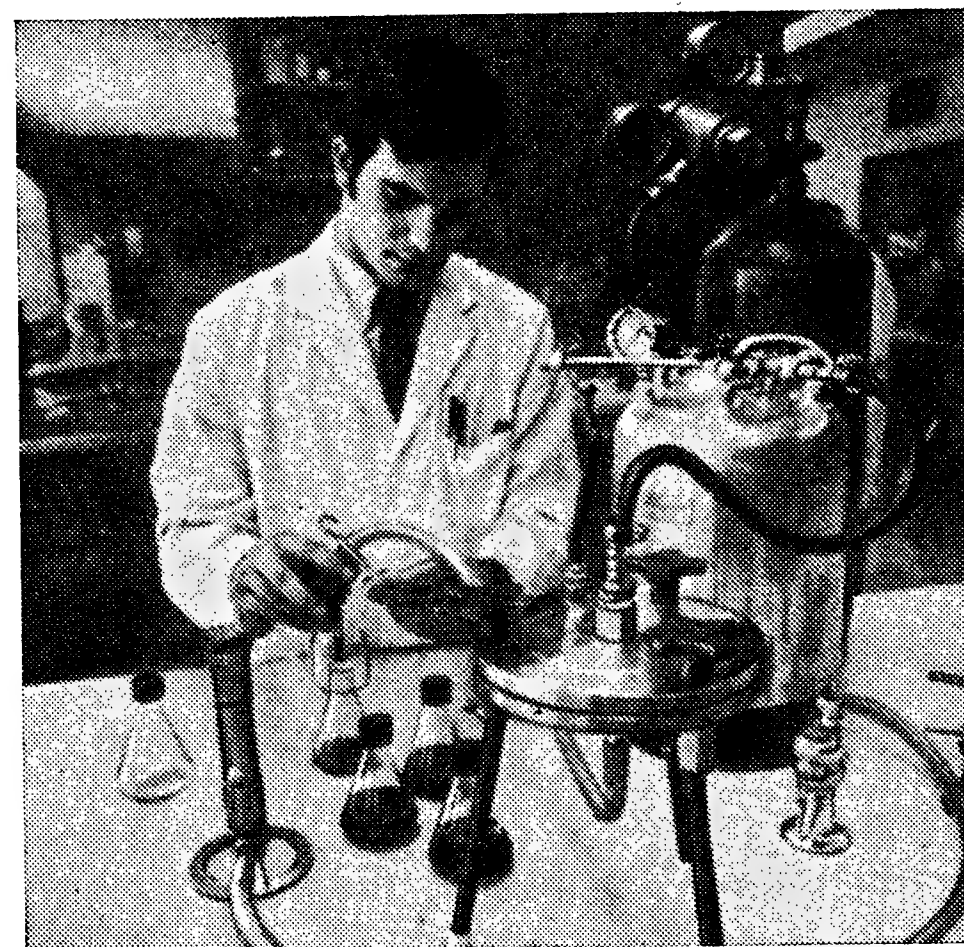


Рис. 2.6. Сосуд высокого давления используется как резервуар для жидкости перед фильтрованием.

Для наполнения серии небольших емкостей служит система разлива с колоколом.

бактерий. Ни на рис. 2.4, ни на рис. 2.5 не показана система предварительного фильтрования через глубинный фильтр, так как она обычно используется только для стерилизации сыворотки или других белковых растворов. Практически во всех остальных случаях стерилизации фильтрованием глубинный фильтр помещают в держатель фильтра непосредственно на мембранный фильтр типа GS. На стр. 59 и последующих описаны способы стерилизации фильтрованием большого числа разных жидкостей; там же подробно охарактеризованы специфические системы для предварительного фильтрования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОЧКИ ОБРАЗОВАНИЯ ПУЗЫРЬКОВ

Мембранный фильтр, насыщенный жидкостью, не пропускает воздуха или газа при тех давлениях, которые обеспечивают их фильтрование через сухой фильтр. Однако при увеличении давления достигается состояние, при котором преодолевается сила поверхностного натяжения в больших порах и жидкость из этих пор выталкивается. Если при этом выходная трубка погружена в жидкость, то при достижении такого состояния и выпускного отверстия внезапно появляются пузырьки, отсюда термин — «точка образования пузырьков». В табл. 2.4 указаны точки образования пузырьков для различных мембранных фильтров, выпускаемых фирмой «Миллипор». Если фильтруемый раствор не водный, то тест на определение точки образования пузырьков проводят с этим раствором. Такой тест служит для проверки мембранного фильтра, т. е. для выяснения истинного размера пор в фильтре. Кроме того, с его помощью можно убедиться, что автоклавирование не повредило фильтр. Так как этот тест не нарушает стерильности и не загрязняет фильтруемого продукта, его можно проводить в любой момент: перед, во время и после фильтрования, но лучше всего определять точку образования пузырьков для фильтрата дважды: после автоклавирования и по окончании фильтрации. Следует, однако, указать, что такой тест не заменяет пробы на стерильность фильтрата. Дело в том, что, хотя фильтр может быть надежным и не пропускать микроорганизмы, фильтрат все же окажется зараженным, например, вследствие недостаточной хорошей стерилизации резервуара для фильтрата и т. д. Качество глубинных фильтров нельзя оценивать с помощью теста на образование пузырьков по следующим причинам. Средний размер пор глубинного фильтра может в десять раз превышать номинальную эффективность фильтрования. Таким образом, утверждение, что в фильтре нет проходов больше среднего размера, еще не гарантирует, что такой глубинный фильтр будет удалять все микроорганизмы из фильтруемой жидкости. Фактически средний размер проходов глубинного фильтра отражает некую среднюю

величину, поскольку в материале глубинного фильтра имеются очень большие и очень маленькие проходы.

Тест на образование пузырьков легко выполним для любой системы фильтрования. Ниже мы опишем этот тест для системы, показанной на рис. 2.4:

1. Фильтр, держатель фильтра, бутылка, в которую фильтруют жидкость, входную и соединительные трубки автоклавируют в собранном виде.

2. Систему соединяют с сосудом высокого давления.

3. При низком давлении фильтруют в приемник небольшое количество жидкости. Это делается для того, чтобы смочить фильтр и погрузить выводную трубку держателя фильтра в жидкость. С помощью отводного клапана, который имеется на верхней стороне всех стандартных держателей фильтра, выпускаемых фирмой «Миллипор», выпускают весь воздух из держателя фильтра.

4. Выключают подачу жидкости и включают подачу регулируемого давления, которое должно быть равно давлению, при котором происходило фильтрование.

5. Постепенно увеличивают давление газа и наблюдают за появлением пузырьков у выводной трубки. Давление, при котором они появляются, и есть точка образования пузырьков. Величину этого давления записывают.

6. После завершения теста выключают подачу газа и продолжают фильтрование. Как только газ достигнет мембранного фильтра, фильтрование сразу же прекращают.

7. Процедуру определения точки образования пузырьков повторяют.

В системе, показанной на рис. 2.5, приемный сосуд не позволяет наблюдать за выводной трубкой при проведении теста на образование пузырьков. В таких случаях предлагается следующая процедура:

1. Приемный сосуд стерилизуют отдельно и затем, соблюдая правила асептики, соединяют с элементами системы, либо все стерилизуют в собранном виде.

2. Держатель фильтра соединяют с сосудом высокого давления. Фильтруют небольшое количество жидкости, чтобы смочить фильтр.

Таблица 2.4

Величина давления, вызывающая образование пузырьков для различных MF-фильтров «Миллипор», смоченных водой

Тип фильтра	Размер пор, мкм	Точка образования пузырьков, мм. рт. ст.
RA	1,2	622
AA	0,8	830
HA	0,45	1660
PH	0,30	2074
GS	0,22	2852

3. Закрывают зажим *P* и открывают зажим *N*. Тест на образование пузырьков проводят в химическом стакане с 70%-ным этанолом.

4. После окончания теста зажим *N* закрывают, открывают зажим *P* и продолжают фильтрование.

5. После окончания фильтрования в химическом стакане проводят еще один тест на образование пузырьков.

РАБОТА С ФИЛЬТРОВАЛЬНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ

Процедура состоит из следующих операций: установки фильтра в держателе, автоклавирования, соединения с другими частями системы, проведения пробы на образование пузырьков, фильтрования, разборки, очистки и высушивания. Особое внимание следует уделять не только тем операциям, которые связаны с фильтрованием, но и операциям, предшествующим ей. Перед сборкой все компоненты держателя фильтра должны быть тщательно высушены: влажный фильтр при автоклавировании повреждается. Обычно мембранные фильтры помещают на нержавеющую металлическую сетку, полученную фототравлением, которую перед тем, как на нее кладут фильтр, высушивают струей чистого, не содержащего паров масла газа, подаваемого из сосуда высокого давления. Как правило, держатели мембранных фильтров

изготавливают из нержавеющей стали, которая, вопреки своему названию, в определенных условиях подвержена коррозии. Коррозия становится серьезной проблемой, когда держатель надолго оставляют грязным и мокрым, особенно если раствор содержит высокую концентрацию ионов хлора. Поверхность держателя, на которой обнаружена коррозия, обрабатывают химическим способом для удаления продуктов коррозии и восстановления поверхности. С этой целью ни в коем случае нельзя применять абразивные материалы, потому что они только способствуют распространению процесса.

УСТАНОВКА ФИЛЬТРА В ДЕРЖАТЕЛЕ

Фильтр осторожно помещают на сетку держателя, подготовленного к работе. Если в системе используется также и предфильтр, то его помещают на мембранный фильтр, следя за тем, чтобы он полностью находился внутри зажимного круга. Кольцевые прокладки, которые применяются для таких держателей, обычно изготовлены из тефлона (PTFE) — вещества, не столь гибкого, как резина. Перед употреблением их необходимо тщательно проверить. В процессе очистки в кольца могут попасть мельчайшие острые кусочки, которые прорут фильтр и его придется заменять новым. Если большая часть поверхности колец стала уплощенной, то обеспечить герметичность не удастся. Две половины держателя плотно стягиваются болтами или винтами. Для соединения держателя с другими частями системы, работающей под давлением, пригодны не всякие трубки. Трубки из медицинского латекса и черной резины использовать нельзя, поскольку в них содержатся вещества, которые могут экстрагироваться. Пригодны трубки из чистого каучука, некоторых полиэтиленов, PVC, так как эти материалы не оказывают повреждающего действия на фильтр. Приемлемы также трубки из резины, обработанной силиконом, и выстланные PTFE. Все новые трубки перед использованием нужно прокипятить в кастрюле с водой и один раз проавтоклавируют. Трубки, которые используют в системе, должны быть устойчивы к тем давлениям, которые необходимы для осуществления фильтрования.

АВТОКЛАВИРОВАНИЕ

Небольшие держатели фильтров целиком заворачивают в бумагу и в таком виде автоклавируют. На большие держатели надевают шланги, конец которых заворачивают в бумагу (рис. 2.7). Аппарат для фильтрации можно автоклавируют вместе с присоединенным



Рис. 2.7. 293-миллиметровый держатель фильтра, подготовленный для автоклавирования.

к нему приемным сосудом, однако объем этого сосуда не должен превышать 2 л, а для проникновения нагретого пара сосуд должен иметь входное отверстие. Автоклавирование проводят при 121 °С; время автоклавирования зависит от типа держателя. Температура в автоклаве, как известно, может не соответствовать показателям приборов, поэтому для проверки температуры при автоклавировании на держатель помещают максимальный термометр. По окончании автоклавирования, как только держатель остынет до комнатной температуры или до температуры, при которой будет осуществляться фильтрация, он готов для работы. Держатель можно быстро охладить холодной водой. Во время автоклавирования стягивающие болты можно ослабить; стягивают их снова лишь тогда, когда аппарат остынет. После этого начинают фильтрацию.

ОЧИСТКА

Окончив фильтрацию, аппарат следует немедленно разобрать и вымыть. Нельзя допускать, чтобы фильтр долго, например в течение ночи, стоял влажным. Все компоненты фильтра моют губкой в горячей воде с жидким детергентом. Поверхности, имеющие резьбу, желоб для прокладочного кольца, пазы и наконечники моют жестким ершиком, чтобы удалить все следы загрязнения. Мы уже упоминали, что для очистки ни в коем случае нельзя употреблять металлическую стружку или абразивный материал. После очистки все детали фильтровального элемента промывают горячей водопроводной водой, несколько раз споласкивают дистиллированной или деионизованной водой и хорошо высушивают. Если вытирать детали тканью или бумагой, то могут остаться волокна, которые загрязнят фильтр.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ЖИДКОСТЕЙ ФИЛЬТРОВАНИЕМ

Естественно, методы, которые применяются для фильтрации разных типов жидкостей, подробно описать невозможно. Однако указать основные принципы выбора системы фильтрации для стерилизации многих жидкостей мы можем. Ранее было сказано, что во всех системах последним фильтром должен быть фильтр GS (0,22 мкм), который гарантирует стерилизацию. Предварительная обработка, делающая весь процесс стерилизации экономичным, зависит от природы фильтруемой жидкости. Прежде чем решить, каким образом расположить фильтры и компоненты системы, свойства фильтруемой жидкости следует сравнить со свойствами жидкости, техника фильтрации которой хорошо известна. Для того чтобы оценить требования, предъявляемые к фильтрованию какой-то конкретной жидкости, все жидкости делят на три группы в зависимости от необходимой предварительной обработки.

1. ЖИДКОСТИ, КОТОРЫЕ ФИЛЬТРУЮТСЯ ЛЕГКО

К первому классу относятся легко фильтрующиеся жидкости. Это почти все прозрачные водные растворы, дистиллированная и деионизованная вода, культураль-

ные среды без сыворотки, спирты, растворы витаминов и многие другие сходные жидкости. Все эти растворы можно фильтровать непосредственно через фильтр GS, на котором лежит прокладка из чистого стеклянного волокна, служащая предфильтром. Такая прокладка (типа AP25, Millipore) значительно удлиняет сроки годности GS-фильтра. На рис. 2.8 схематически показана работа предфильтра из стеклянного волокна. Водопроводную воду можно стерилизовать прямо через GS-фильтр с предфильтром из стеклянного волокна. Однако если в ней обнаружена высокая концентрация коллоидного материала, то такую воду лучше фильтровать так, как фильтруют жидкости, требующие предварительной обработки (см. ниже). В табл. 2.5 приведены данные, относящиеся к фильтрованию жидкостей, для которых достаточно только GS-фильтра и предфильтра из стеклянного волокна.

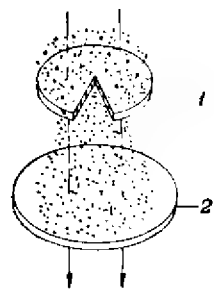


Рис. 2.8. Предфильтр (1) из тонкого стеклянного волокна помещают непосредственно на миллипоровый фильтр (2) в том же держателе.

2. ЖИДКОСТИ, ТРЕБУЮЩИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ

Следующий класс включает жидкости, требующие большой предварительной обработки, прежде чем их можно пропускать через GS-фильтр. Это жидкости, содержащие твердые частички или белок в достаточно высокой концентрации. К ним относятся многие масла, несинтетические бактериологические бульонные среды, антибиотики, противовирусные вакцины и среды для культивирования тканей, в которых присутствует менее 2% нефилтрованной сыворотки. Такие жидкости нуждаются в предварительной обработке: предфильтрации, отстаивании и даже центрифугировании. Чаще всего применяют предфильтрацию, так как центрифугирование в тех случаях, когда объем жидкости составляет

Таблица 2.5

Производительность фильтрования жидкостей, для которых требуется минимальная предварительная обработка перед стерилизацией

Растворы	Диаметр фильтра, мм	Тип фильтра	Производительность
1. Дистиллированная вода	293	GS (0,22 мкм)	4500 л за 3 ч при 1037 мм рт. ст.
2. Пропиленгликоль (80% конц.)	142	GS (0,22 мкм) + предфильтр AP25	14 л за 1 ч при 1555 мм рт. ст.
3. Раствор Хэнкса	293	То же	250 л за 30 мин при 777 мм рт. ст.
4. Вазелин (при 54 °C)	142	GS (0,22 мкм)	20 л за 1 ч при 4140 мм рт. ст.
5. Пентатол натрия	142	UG (0,25 мкм) + предфильтр AP25	80 л за 1 ч при 1740 мм рт. ст.
5. Водопроводная вода	293	GS (0,22 мкм) + предфильтр AP25	1000 л за 1 ч при 2589 мм рт. ст.

несколько литров, трудно осуществимо. Отстаивание эффективно только для крупных частиц, которые легко задерживаются и в глубинных фильтрах. Для предфильтрования используют глубинные фильтры из разного материала: асбеста, стеклянного волокна, особой ваты и даже диатомовой земли. В основном используют два типа глубинных фильтров: асбестовые прокладки и патроны, состоящие из стеклянного волокна или особой ваты. Обычно в собранном виде фильтрующий элемент состоит из держателя стекловолнистого фильтра, который помещают над 142-миллиметровым держателем GS-фильтра. Эта система применяется для стерилизации противовирусной вакцины, которую сначала еще отстаивают в течение двух часов для отделения клеточного детрита. Производительность такой системы указана в табл. 2.6.

Таблица 2.6

Производительность фильтрования жидкостей, которые необходимо предварительно обрабатывать перед стерилизацией

Растворы	Диаметр фильтра, мм	Фильтры	Производительность
1. Среда для культивирования тканей (с 2% нефильтрованной сыворотки)	142	GS (0,22 мкм) + предфильтр AP25	20 л за 40 мин при 777 мм рт. ст.
2. Среда 199 (10X)	142	То же	15 л за 50 мин при 622 мм рт. ст.
3. Прозрачный раствор инсулина	142	HA (0,45 мкм) + AA (0,88 мкм) + предфильтр AP25	5 л за 40 мин при 1555 мм рт. ст.
4. Прозрачная противовирусная вакцина	293	GS (0,22 мкм) + стекловолокнистый патрон (0,5 мкм)	100 л за 40 мин при 1037 мм рт. ст.

При использовании для предварительного фильтрования асбестовых прокладок незначительное изменение разности давления при работе, которое может привести к разрыву предфильтра, не очень опасно, поскольку фильтр GS полностью задерживает любые бактерии. Следует отметить, что асбестовые прокладки обладают очень высокой способностью поглощения; это обусловлено главным образом электростатическим эффектом, создаваемым положительным зарядом асбестовых волокон. Благодаря такой поглотительной способности асбестовые фильтры задерживают частицы, микроорганизмы и т. д., размер которых значительно меньше размеров пор фильтра. Сила поглощения столь высока, что при фильтровании противовирусной вакцины через необработанный асбестовый фильтр большая часть вирусных частиц сорбируется на фильтре и титр вакцины значительно снижается. Для того чтобы уменьшить электростатический эффект, асбестовые фильтры предварительно обрабатывают раствором желатин, который



покрывает волокна фильтрующего материала и резко уменьшает его адсорбционную способность. Однако такая обработка сильно влияет на фильтрационные свойства асбестовой прокладки. Она становится ничуть не лучше стекловолокнистого фильтра, не имеющего заряда и поэтому не обладающего столь высокой способностью поглощения, какая присуща необработанному асбестовому фильтру. Таким образом, при фильтровании жидкостей, содержащих «активный» компонент (вирусные частицы, ферменты), в качестве предфильтров лучше использовать стекловолокнистые или ватные, а не асбестовые фильтры. Через асбестовые фильтры фильтруют жидкости, содержащие небольшие количества нефильтрованной сыворотки. Применение асбестовых фильтров для фильтрования сыворотки подробно изложено в следующем разделе, где разбираются методы фильтрования белковых растворов, сыворотки и культуральной среды, содержащей до 10% сыворотки. Подводя итог всему сказанному выше, еще раз напомним, что к выбору предфильтра следует относиться с должным вниманием, так как некоторые из них оказывают неблагоприятное действие на фильтруемую жидкость.

3. ЖИДКОСТИ, КОТОРЫЕ ФИЛЬТРУЮТСЯ ТРУДНО

Этот раздел посвящен методам фильтрования жидкостей, которые с трудом проходят через фильтр. К числу таких жидкостей относятся сыворотка, плазма, трипсин, экстракты аллергенов и культуральные среды, содержащие более 2% нефильтрованной сыворотки. Из жидкостей этого класса больше всего приходится работать с сывороткой, производимой в больших количествах для разных целей, в том числе для приготовления культуральных сред.

Прежде чем перейти к подробному описанию систем фильтрования, которые широко используются для стерилизации сыворотки, укажем на основные принципы, которыми желательно руководствоваться при стерилизации сыворотки и белковых растворов.

1. Сыворотку или белковый раствор следует фильтровать по возможности сразу же после того, как они по-

лучены. Если сыворотку и белковые растворы хранят при низких температурах более 24 ч, то происходит выпадение коллоидных агломератов. Эти агломераты быстро забивают GS-фильтр, размер пор которого составляет 0,22 мкм, и даже фильтры с большим диаметром пор. Следовательно, наша задача существенно упрощается, если мы профильтруем сыворотку до выпадения агломератов.

2. Сыворотку и белковые растворы перед фильтрованием лучше подогреть до 30—35 °С, хотя обычно их хранят охлажденными. Через один GS-фильтр можно профильтровать в четыре раза больше теплой сыворотки, чем холодной.

3. Фильтрование лучше проводить под положительным давлением, так как в этом случае фильтрат не вспенивается. Было обнаружено, что вспенивание, которое наблюдается при фильтровании сыворотки в вакууме, вызывает денатурацию белков.

4. В тех случаях, когда это возможно, сыворотку и белковые растворы лучше отцентрифугировать при максимальной скорости в течение не менее 30 мин.

Существуют две основные системы, используемые для фильтрования сыворотки и белковых растворов. Выбор какой-либо из них всецело зависит от объема фильтруемой жидкости. Для объемов менее одного литра наиболее оптимальной является система серийного фильтрования, тогда как для объемов более одного литра наиболее экономичной является система, в которой используется предварительное фильтрование через асбестовый фильтр, а затем через комбинацию мембранных фильтров НА (0,45 мкм) и GS (0,22 мкм). В тех случаях, когда фильтруемая сыворотка используется как добавка к среде для культивирования особо «капризных» клеток, некоторые авторы считают недопустимым применение асбестовых префильтров, поскольку, по их мнению, они влияют на рост клеток. Тогда используют систему серийного фильтрования и для объемов более одного литра. Однако в большинстве случаев такой процесс не столь экономичен, как с применением асбестовых префильтров. Поскольку все же существуют сомнения относительно возможности использования

асбестовых префильтров, ниже будет рассмотрена техника серийного фильтрования сыворотки для объемов более 1 л.

Коротко говоря, серийная фильтрация — это метод увеличения количества сыворотки или белкового раствора, пропускаемого через один фильтр за счет предварительной фильтрации раствора через серию мембранных фильтров с постепенно уменьшающимся диаметром пор. Фильтры с более крупными порами задерживают большую часть коллоидного материала, который быстро засоряет GS-фильтр. Мембранные фильтры лучше разделять прокладками из дакрона, которые увеличивают полезную площадь отдельного фильтра и, следовательно, пропускную способность системы. При наличии таких прокладок фильтры не закрывают поры друг у друга, а сорбируемое загрязнение распределяется более равномерно. Прокладки, как правило, можно мыть и использовать повторно.

Фильтрование жидкости объемом менее 50 мл

Сыворотку, объем которой менее 50 мл, фильтруют через систему, состоящую из фильтрующего элемента, соединенного с выходным отверстием шприца. Фирма



Рис. 2.9. Для разлива стерильной среды в пробирки пользуются автошприцем, снабженным 25-миллиметровым держателем с фильтром.

«Миллипор» выпускает держатели, в которые можно помещать набор мембранных фильтров диаметром 25 мм. Такие держатели имеют насадку для непосредственного соединения со шприцем Люэра. На рис. 2.9 показан держатель фильтра, соединенный с автошприцем («Миллипор»), который используется для стерилизации жидкостей.

Фильтрация жидкости объемом до 500 мл

Система фильтрации для стерилизации сыворотки и белковых растворов в объемах до 500 мл представляет собой держатель фильтра, изготовленный из нержа-

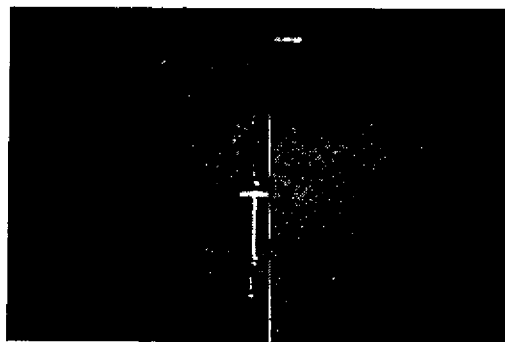


Рис. 2.10. 47-миллиметровый металлический держатель фильтра высокого давления с цилиндром на 100 мл, который служит резервуаром для раствора.

вующего материала («Миллипор»), и находящийся под давлением (рис. 2.10). В такой держатель можно поместить набор фильтров и в собранном виде автоклавировать. Держатель фильтра снабжен цилиндрическим резервуаром объемом 100 мл. Если количество фильтрующейся жидкости составляет 100—200 мл, то можно использовать этот резервуар, наполняя его один или два раза. Однако если объем фильтруемой жидкости превышает 200 мл, то резервуаром для нее служит сосуд вы-

сокого давления, из которого жидкость поступает в держатель фильтра под давлением сжатого азота из баллона. Такая система показана на рис. 2.6.

Фильтрация жидкости объемом от 500 мл до 5 л

При фильтрации объемов более 500 мл, но менее 5 л резервуаром для жидкости служит сосуд высокого давления, который соединен с держателем фильт-

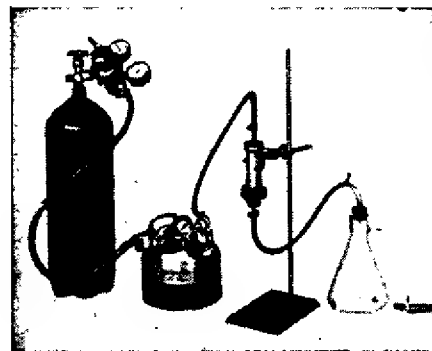


Рис. 2.11. 142-миллиметровый держатель фильтра, соединенный с четырехлитровым баллоном высокого давления.

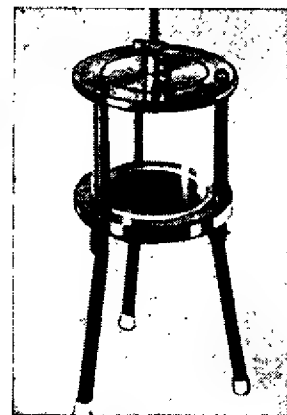


Рис. 2.12. 142-миллиметровый держатель фильтра с 2-литровым резервуаром для фильтруемой жидкости.

ра (размером 90 или 142 мм). Такая система показана на рис. 2.11: 142-миллиметровый держатель фильтра соединен с сосудом высокого давления объемом 4 л. Для держателей фильтра размером 90 или 142 мм фирма «Миллипор» выпускает также резервуары, представляющие собой полые цилиндры из пластика или нержавеющей стали, которые находятся между верхней и нижней пластинами держателя фильтра. Такая система с резервуаром для жидкости и держателем фильтра (142 мм) показана на рис. 2.12. Этот резервуар вмещает

до 1,5 л жидкости и вполне пригодны для стерилизации нескольких литров сыворотки без использования сосуда высокого давления. К такой системе можно подсоединить набор серийных фильтров и автоклавируют систему в целом перед стерилизацией фильтрованием.

Фильтрование жидкости объемом до 100 л

При фильтровании больших количеств сыворотки (до 100 л) применяют асбестовые фильтры. Это снимает необходимость в крупнопористых мембранных фильтрах, поэтому в наборе мембранных фильтров оставляют только фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм. Обычно меньшие количества сыворотки фильтруют без помощи асбестовых фильтров, поскольку размер выпускаемых фильтров не позволяет использовать их для стерилизации в лабораторных условиях. Асбестовые подушки, применяемые при фильтровании сыворотки, имеют преимущества по сравнению с другими глубинными фильтрами, поскольку они сорбируют агломераты коллоидных белков, которые очень быстро засоряют мембранные GS-фильтры. Типичный фильтрующий элемент для стерилизации 25 л сыворотки содержит фильтр-пресс приблизительно из пяти 14-сантиметровых асбестовых прокладок (типа S10 Carlson—Ford) для предварительной обработки и набор мембранных фильтров (HA—0,45 мкм и GS—0,22 мкм), которые помещены в держатель диаметром 293 мм. С помощью такой системы 30 л сыворотки стерилизуют за 2 ч при разности давления в системе 2333 мм рт. ст. Предфильтры из очищенного стекловолокна и даже диатомовой земли не столь эффективны, как из асбеста. В табл. 2.7 приведены данные, касающиеся фильтрования различных растворов, содержащих белки.

Фильтрование культуральной среды, содержащей 10% сыворотки

В этом разделе мы опишем оптимальные условия фильтрования для стерилизации культуральной среды, содержащей около 10% сыворотки. Сначала стерили-

Таблица 2.7

Производительность фильтрования растворов, содержащих высокие концентрации белков

Растворы	Диаметр фильтра, мм	Фильтры	Производительность
1. Телячья сыворотка (предварительно профильтрована через асбестовые прокладки)	293	GS (0,22 мкм) + HA (0,45 мкм)	30 л за 2 ч при 2074 мм рт. ст.
2. Прозрачная плазма (предварительно профильтрована через асбестовые прокладки)	142	То же	6 л за 90 мин при 1555 мм рт. ст.
3. Гамма-глобулин, 4%-ный	142	GS (0,22 мкм) + HA (0,45 мкм) + AA (0,8 мкм) + SM (5,0 мкм) + предфильтр AP25	10 л за 1 ч при 1037 мм рт. ст.
4. Гамма-глобулин, 25%-ный	293	GS (0,22 мкм) + HA (0,45 мкм) + предфильтр из асбеста	53 л за 2 ч при 1037 мм рт. ст.

зуют культуральную среду, используя для этой цели фильтрующий элемент, состоящий из стекловолокнуистой прокладки, которую помещают на мембранный фильтр GS. Таким же способом отдельно стерилизуют сыворотку. Затем оба раствора смешивают и фильтруют через стекловолокнуистую прокладку, положенную на мембранный фильтр GS. Если сыворотка до стерилизации хранилась более 48 ч, то на мембранный фильтр GS лучше помещать прокладку из чистого асбеста для удаления коллоидных агломератов белков, которые обычно образуются при длительном хранении сыворотки. Производительность такой системы, состоящей из асбестовой прокладки диаметром 293 мм (типа S10 Carlson—Ford)

и одного фильтра GS диаметром 293 мм, при фильтровании среды с 10% сыворотки составляет 200 л в 1 ч при разности давлений 1555 мм рт. ст.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА ФИЛЬТРУЮЩЕГО ЭЛЕМЕНТА

Мы не сможем выбрать наиболее эффективную систему для фильтрования жидкости, свойства которой неизвестны, если не располагаем некоторыми экспери-



Рис. 2.13. Аппарат для определения размера фильтра, необходимого для фильтрования определенного объема среды.

ментальными данными. Наиболее простой способ получения этих данных описан ниже. Берем небольшой держатель фильтра, например 25-миллиметровый микрошприц, и определяем, какие количества жидкости проходят через его фильтр при разных давлениях. Площадь для фильтрования больших объемов можно подсчитать по формуле

$$\frac{A}{a_s} = 1,5 \frac{V+}{v_s}$$

или

$$A = 1,5 \frac{V+}{v_s} a_s,$$

где v_s — объем пробы (мл); a_s — площадь фильтрации (см^2) в держателе фильтра, через который фильтруют пробу; $V+$ — объем жидкости, стерилизуемой фильтрованием; A — площадь, необходимая для стерилизации фильтрованием; 1,5 — коэффициент.

На рис. 2.13 показан 25-миллиметровый пропиленовый держатель фильтра (Swinnex-25), который используют для определения площади при фильтровании больших объемов. Площадь фильтрации в различных держателях фильтров, выпускаемых фирмой «Миллипор», приведены в табл. 2.8.

Таблица 2.8

Площадь фильтрации в держателях фильтров различного диаметра

Держатель фильтра	Диаметр фильтра, мм	Диаметр пред-фильтра, мм	Эффективная площадь фильтрации, см^2	Продолжительность автоклавирования, мин	Сочленение
SW-13	13	10	0,7	12—15	Шприц Люэра
SW-25	25	22	3,4	12—15	То же
SW-47	47	35	13,8	15	Шприц Люэра и трубка
Swinny	13	10	0,8	15	Шприц Люэра
Микрошприц	25	22	3,9	15	То же
Sterifil	47	35	13,8	20	Шланг, 6 мм
47 мм	47	42	11,3	20—25	Шланг, 11 мм
90 мм	90	75	39	20—25	То же
142 мм	142	124	97	25—30	»
293 мм	293	257	486	35—45	Шланг, 14 мм

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ГАЗА

При фильтровании газа чрезвычайно специфическая поверхность и высокое удельное сопротивление мембранных фильтров создают значительный электростатический заряд, который препятствует прохождению частиц, гораздо меньших, чем размер пор. В результате эффективность фильтров возрастает, так что фильтры, диаметр пор которых равен 0,5 мкм, обеспечивают стерилизацию газов. Для фильтрования воздуха и других газов наи-

более пригодны гидрофобные фильтры Solvinert, выпускаемые фирмой «Миллипор». Химическая структура материала, из которого изготовлены такие фильтры, модифицирована, поэтому они не смачиваются водой, но проницаемы для воздуха. Давление, при котором происходит интрузия воды в таких фильтрах, соответству-



Рис. 2.14. Держатель фильтра Swinnex-47 обеспечивает стерильность выходного отверстия сосуда высокого давления.

ет давлению на стандартный фильтр, при котором появляются пузырьки. Гидрофобные фильтры можно автоклавируют отдельно или стерилизовать паром вместе с держателем. Они устойчивы также к сухому жару до 200 °C.

Широко используемые для стерилизации газа глубинные фильтры, такие, как стеклянное волокно, пресованная вата, спеченное стекло и т. д., имеют много недостатков. Случайная ориентация фильтрующего материала часто приводит к образованию легко доступных проходов в фильтре. Это может привести к неполноценной фильтрации, особенно при отсоединении вакуумного насоса. При увлажнении фильтра парами или фильтратом может наблюдаться его зарастание.

Процесс фильтрации сопровождается переходом жидкости из одного сосуда в другой, поэтому необходимо, чтобы оба сосуда имели выходные отверстия. При

стерилизации фильтрованием сосуд, в который собирают фильтрат, должен вентилироваться через стерилизующий фильтр, чтобы в него не попадали микроорганизмы из воздуха. Идеальными для этого являются мембранные фильтры, помещенные в соответствующие держатели. В лабораторных условиях рекомендуется использовать держатель Swinnex-47 («Миллипор»), преимущество которого состоит в таком расположении фильтров в нем, которое гарантирует стерильность как при заполнении, так и при опустошении сосудов. На рис. 2.14 показан держатель Swinnex-47 с гидрофобным фильтром Solvinert, который служит стерильным выходным отверстием в небольшом сосуда высокого давления.

РЕЗЮМЕ

Применение мембранных фильтров для стерилизации фильтрованием сделало этот процесс чрезвычайно надежным. В сущности, вероятно, все жидкости экономичнее фильтровать через мембранные фильтры при условии, что система предварительной обработки этих жидкостей выбрана правильно.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Flood J. E., Porter H. F., Fennie F. W., "Filtration Practice Today", Chem. Engng, Albany, 73, 163 (1966).
2. Osgood G., "Filter Sheets and Sheet Filtration". Presented to the Filtration Society, London, September, 1966.
3. Garvan J. M., Cunner B. W., "The Harmful Effects of Particles in Intravenous Solutions". Med. J. Aust., 2, 1 (1964).
4. Portner D. M., Phillips C. R., Hoffmann R. K., "Certification of probability of sterilisation of liquid by filtration", Appl. Microbiol., 15, (4), 800 (1967).

ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК В ПЛАСТИКОВЫХ ПАНЕЛЯХ ДЛЯ МИКРОТИТРОВАНИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

М. РОЗЕНБАУМ, Э. СУЛЛИВАН и Э. ЭДВАРДС

Naval Medical Research Unit No. 49,
Great Lakes, Illinois, USA

ВВЕДЕНИЕ

Для культивирования клеток обычно используют стеклянные сосуды. В вирусологических и серологических тестах, которые ставятся на клеточных культурах, чаще всего применяют стеклянные пробирки с завинчивающимися пробками. При таком способе культивирования необходимы значительные количества дорогостоящих сред и клеток, большая часть которых оказывается лишней при проведении теста. Эти пробирки неудобны в обращении и занимают много места на рабочем столе и в термостате. Кроме того, процедура смены пробок не только трудоемка, но и связана с некоторым риском, поскольку стекло бьется. Следовательно, такая методика неэкономична, требует значительных затрат времени и многочисленного технического персонала; лишь немногие вирусологические лаборатории могут проводить широкие эпидемиологические исследования.

Некоторые из этих недостатков легко преодолеть, если культивировать клетки в пластиковых панелях с углублениями (микрополищашки). Для образования монослоя клеток Барский и Лепайн [1] использовали акриловые чашки. Эти клетки можно инфицировать вирусом полиомиелита и наблюдать патологические изменения в них с помощью микроскопа. На таких чашках можно проводить реакцию нейтрализации сывороточными антителами и титрование инфекционности частиц. Мельник и Ортон [2] использовали непрозрачные пластиковые пластинки с лунками для колориметрического определения антител, специфичных в отношении вируса

полиомиелита. Джонстон и Грейстон [3], а также Леннет и др. [4] разработали колориметрический метод определения антител, нейтрализующих аденовирус, с использованием пластиковых пластинок. Рейтсел и др. [5] провели целый ряд вирусологических опытов на пластинках из мягкого поливинилового пластика, имеющих углубления; эти авторы предложили использовать их для тестирования противовирусных препаратов. Поскольку поливиниловый пластик прозрачен, можно проводить и микроскопические наблюдения.

Преимущества пластиковых пластинок бесспорны. Они дешевле и удобнее стеклянных пробирок. Использование таких пластинок при выращивании клеток и постановке вирусологических опытов экономит не только время, но и дорогостоящие реактивы. Они занимают меньше места, и их можно выбрасывать после однократного использования; таким образом, отпадает необходимость в тщательном мытье и стерилизации.

Преимущества пластиковых пластинок для культивирования стали еще более очевидными после того, как Такачи [6] применил технику микротитрования для клеточных культур. Первоначально она была разработана для серологических тестов в вирусологии, которые осуществлялись без использования клеточных культур. Позднее Север [7] модифицировал ее для колориметрического определения вируса полиомиелита в клеточной суспензии. Розенбаум и др. [8, 9] показали, что монослой клеток различных типов можно культивировать в лунках на пластинках, изготовленных из твердых (плексиглас) или мягких (поливинил) пластмасс (Cooke Engineering Co., Alexandria, Va.).

Принцип микротехники Такачи оригинален и прост. В большинстве случаев биологические жидкости анализируют приготовлением последовательных разведений анализируемого материала (пробы) в определенном объеме растворителя. Для серологических исследований чаще всего применяют двукратные разведения, а для титрования вирусов — десятикратные. При обычном способе приготовления последовательных разведений используют стеклянные пипетки; в микросистеме пользуются «петлей», с помощью которой можно манипулиро-

вать с малыми объемами (0,025 мл) пробы. Этот объем добавляют к равному или большому объему растворителя, взятого микропипеткой. Таким образом, для получения разведения потребуется меньше времени, чем для проведения макрометода; при этом затратится и значительно меньше реактивов. Отмеченные преимущества, а также возможность получения микрокультур клеток делают эту систему чрезвычайно полезной для многих исследований, в которых применяют клеточные культуры.

В следующем разделе рассматриваются современные способы получения тканевых культур в пластинках с углублениями, их использование и возможности применения.

МИКРОТИТРОВАНИЕ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

А. ОБОРУДОВАНИЕ

Основные принадлежности, необходимые для микротитрования, показаны на рис. 3.1. К ним относятся пластинка с лунками, микропипетка-капельница, петля, резиновая подставка и специальный бланк из фильтровальной бумаги для проверки правильности заполнения петли.

Пластинки, микропипетки и петли выпускают разные фирмы, например Cooke Engineering Co., Alexandria, Va.; Microbiological Associates, Bethesda, Md.; Linbro, New Haven, Conn. Недавно фирма Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md. стала выпускать не только усовершенствованные микропипетки, но и специальные адаптированные к ним линии различных клеток.

1. Пластинки с лунками

Их изготавливают из разных типов пластика. Пластинки, сделанные из твердого акрила (плексигласа), сравнительно дороги, но их можно использовать неоднократно. Обычно в них проводят реакцию связывания компонента и тест на гемагглютинацию; кроме того, они пригодны для культивирования клеток. Пластинки дела-

ют также из мягкого поливинилового пластика. Такие пластинки не дороги, и их можно выбрасывать после употребления. Они пригодны для большинства методов, описанных ниже. Пластинки бывают разной величины с различным числом и расположением лунок. Дно этих лунок служит поверхностью, на которой клетки образу-

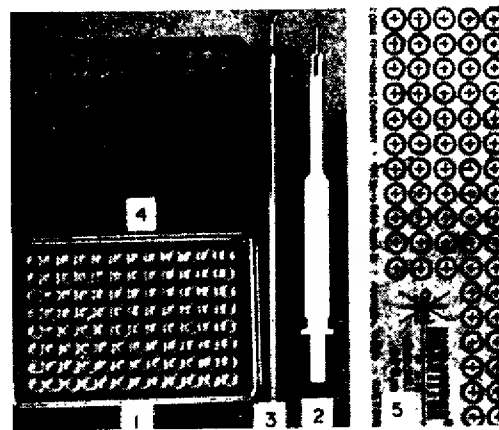


Рис. 3.1. Принадлежности для микротитрования.

1 — пластинка с лунками для культивирования клеток; 2 — микропипетка объемом 0,025 мл; 3 — петля для переноса материала объемом 0,025 мл; 4 — резиновая подставка для пластинки; 5 — бланк для проверки петли.

ют монослой. Дно лунки может быть либо U-образным, либо плоским. Пластинки и с U-образными лунками пригодны в тех случаях, когда методика культивирования не требует микроскопических исследований при больших увеличениях. При увеличениях более чем в 100 раз желательно использовать пластинки с плоскостонными лунками. Пластинка, показанная на рис. 3.1, имеет размер 8×12 см и содержит 96 U-образных лунок. Объем каждой лунки составляет примерно 0,25 мл. Для пластинок из гибкого, мягкого пластика применяют резиновые подставки.

Очень часто новые пластинки токсичны для клеток. Для снятия токсического эффекта пластинки замачива-

ют на 1—2 ч в 70—90%-ном этиловом или изопропиловом спирте. (Некоторые исследователи предварительно моют их детергентом, но мы не считаем это необходимым.) Нельзя допускать испарения спирта, ибо это фиксирует токсические свойства. После промывки спиртом пластинки переворачивают вверх дном, чтобы стек спирт, а затем промывают сначала в трех сменах водопроводной воды, потом в трех сменах тридистиллированной воды. Воду тщательно стряхивают, а пластинки высушивают на воздухе и хранят в коробках, в которых их выпускают.

Пластинки не стерилизуют, если в культуральной среде содержатся антибиотики. В тех случаях, когда для проведения опыта требуется абсолютная стерильность, чашки предварительно стерилизуют, либо облучая ультрафиолетом, либо обрабатывая окисью этилена.

Лунки можно закрыть прозрачной клейкой лентой или 1—2 каплями легкого минерального масла (Drakeol, Pennsylvania Refining Co., Butler, Pa.). При культивировании клеток в термостате во влажной атмосфере, насыщенности CO_2 , масло служит защитой от пыли.

2. Микропипетки

Микропипетки, или капельницы, изготовляют из твердого пластика (полипропилена), выдерживающего автоклавирование. Каждая пипетка заканчивается иглой, выходное отверстие которой имеет определенный диаметр, так что объем высвобождающейся капли равен 0,025 или 0,05 мл. Такие микропипетки используются для заполнения лунок одинаковым количеством жидкого материала, например растворителем, суспензией клеток, дозой вируса. В качестве меры предосторожности пипетку затыкают ватной пробкой. Некоторые исследователи предпочитают пользоваться дешевыми пастеровскими пипетками с калиброванным входным отверстием, которые можно выбрасывать после употребления. Жидкость насасывают в пипетку, после чего кончик иглы вытирают стерильной тканью для того, чтобы удалить избыток жидкости. Частота капель обычно контролируется давлением пальца; можно так-

же пользоваться резиновым баллончиком (рис. 3.2). Во время работы пипетки следует держать в строго вертикальном положении для получения точного объема капли.

3. Петли

Важным новшеством в методике микротитрования явилось использование петли для переноса и разведения исследуемого материала. Такая петля представляет собой по сути дела модифицированную бактериологическую петлю и применяется для точного переноса определенного объема жидкости. Если петлю опустить и вынуть из жидкости, то внутри кольца благодаря капиллярным силам и силам поверхностного натяжения образуется пленка. Действие этих сил исчезает, когда петлю помещают в какую-либо жидкость, в результате чего пленка высвобождается в эту жидкость и происходит разведение. В основе титрования разведением лежит последовательный перенос петлей определенного объема исследуемого материала в определенный объем жидкости.

Петли могут иметь различную конструкцию. Петля, примененная впервые Такачи, представляла собой проволочную спираль, закругленную в форме шара. Позднее была сконструирована петля в форме тюльпана (рис. 3.3). Такая петля гораздо удобнее, чем спираль, поскольку она меньше повреждается при работе. С помощью петли каждого из этих типов можно переносить объем, составляющий 0,025 мл (имеются петли, переносящие 0,05 мл). Изготавливают петли из нержавеющей стали, очищают и стерилизуют в пламени горелки.



Рис. 3.2. Заполнение лунок микропипеткой.

Сухие петли адсорбируют меньшее количество жидкости. Для точного переноса исследуемого материала перед употреблением петлю опускают в стерильный физиологический раствор или другой растворитель. Для того чтобы определить, правильно ли заполнилась петля, пользуются специальным бланком фильтровальной бу-



Рис. 3.3. Петля в виде тюльпана из нержавеющей стали (увелич. в 5 раз).

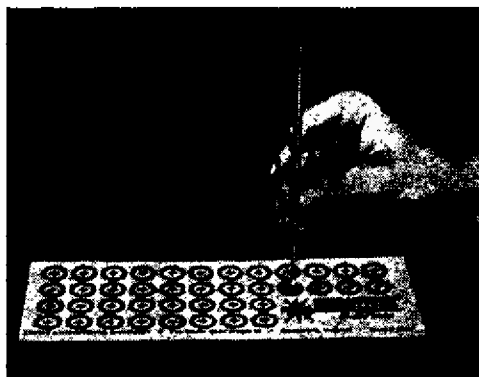


Рис. 3.4. Бланк для проверки петли.

маги (блоттером) с напечатанными на них окружностями (рис. 3.4). Петлей, смоченной в физиологическом растворе, касаются центра окружности на бумаге. Жидкость впитывается бумагой, и внутри в пределах окружности образуется темное пятно (рис. 3.4). Оставшаяся пленка служит затравкой при заполнении петли исследуемой жидкостью. Эта процедура, однако, не позволяет решить, правильно ли откалибрована петля.

Б. КАЛИБРОВКА ПЕТЛИ

Простой метод калибровки и регулировки петель по показателю преломления предложен Эдвардсом и др. [10]. Калибровка осуществляется приготовлением раз-

ведений сыворотки в солевом растворе и определении показателя преломления каждого разведения. Существует несколько типов недорогих приборов для определения показателя преломления (например, TS Meter, выпускаемый фирмой American Optical Co., Buffalo, N. Y.). По показаниям прибора строят график в логарифмической шкале; если линия регрессии прямая, то петля отрегулирована правильно, если нет, то с помощью пинцета или другого инструмента нужно поправить отверстие петли. Правильность калибровки необходимо проверять у новых петель и периодически после использования у старых.

В. РАЗВЕДЕНИЕ

Соблюдение определенной последовательности при работе с петлями дает возможность стандартизировать метод. Эта последовательность, предложенная Севером [7] и модифицированная в нашей лаборатории, схематически показана на рис. 3.5. Следует подчеркнуть, что пауза между этапами 4 и 5 может привести к тому, что на петле исчезнет затравка, в результате чего титры окажутся ошибочными. Для наполнения петли достаточно лишь коснуться ею поверхности раствора. При этом необходимо следить, чтобы петля не касалась пузырьков воздуха. При титровании неинфекционного материала этап 7 (деконтаминация) может быть опущен. Одновременная работа с 8 петлями требует тренировки, особенно при последовательном переносе материала в другие углубления (рис. 3.6). Начинаящие обычно работают с 4 петлями. По мере приобретения определенных навыков число петель увеличивают до 8 и тогда можно одновременно титровать все 8 образцов, помещающихся на пластинке 8×12. Каждый, кто работает с петлями, должен тщательно выполнять последовательность действий, показанную на рис. 3.5. Это крайне важно для получения воспроизводимых результатов по определению титра. Петли используются не только для разведения вируса и сыворотки. Они пригодны для разведения клеточной суспензии, определения токсинов, антитоксинов, антивирусных препаратов и других растворов или суспензий.

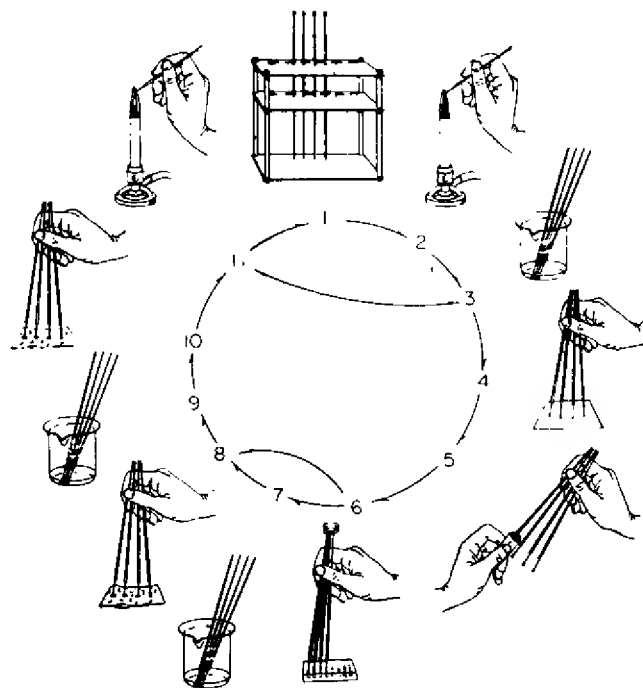


Рис. 3.5. Использование петли при переносе и разведении исследуемого материала.

1 — штатив для петель; 2 — очистка петли в пламени (после этого петлю следует охладить); 3 — заполнение петли разбавителем для затравки (1 мин); 4 — проба на бланке; 5 — заполнение петли исследуемым материалом; 6 — разбавление исследуемого материала вращением петли; 7 — дезинфекция петли (вирусологические исследования) в 0,5%-ном растворе гипохлорита натрия (1 мин); 8 — удаление жидкости из петли с помощью куска марли; 9 — споласкивание петли в дистиллированной воде; 10 — удаление жидкости из петли; 11 — очистка в пламени (после этого петлю следует вновь охладить).

Г. МИКРОСКОПЫ

Результаты различных тестов можно наблюдать с помощью либо макро-, либо микрометодов. Для исследования вирусов, вызывающих патологические изменения в клетках или их лизис, необходим микроскоп. Наблюдения за состоянием живых клеток в культивируемых пластиковых пластинках, а также за последова-

тельными изменениями, вызванными действием вирусов, осуществляют в обычном или инвертированном микроскопе. Преимущества инвертированного микроскопа в том, что положение клеток и жидкости можно не менять (рис. 3.7). Это особенно важно в тех случаях, когда отверстия углублений не заклеены. В других случаях, когда пластинки можно перевернуть без ущерба для содержимого, применяют обычный микроскоп.

Титр вирусов часто определяют колориметрическим способом по подавлению метаболизма в клетках. Рост вируса или подавление клеточного метаболизма оценивают по изменению цвета индикатора pH (нетоксичного для клеток), входящего в состав среды.

Гемагглютинация может быть использована для макроскопического исследования миксовирусов и других агентов, вызывающих этот эффект.

Мы перечислили только основное оборудование, необходимое для культивирования клеток и проведения анализа. Разработана система автоматического титрования (Autotiter, Astec, Inc., Orange, Conn.), которая может быть очень полезна при проведении серологических исследований в широких масштабах.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Многие типы клеток, которые растут на стекле, можно культивировать в микрополищашках [9]. К ним относятся первичные или вторичные культуры разных органов, полупостоянные штаммы (например, диплоидные



Рис. 3.6. Техника разведения с одновременным использованием восьми петель.

клетки, полученные из эмбриональных легких человека) или перевиваемые линии клеток злокачественного происхождения. Методика культивирования клеток в микросистеме сходна с макрометодами, но для нее требуются

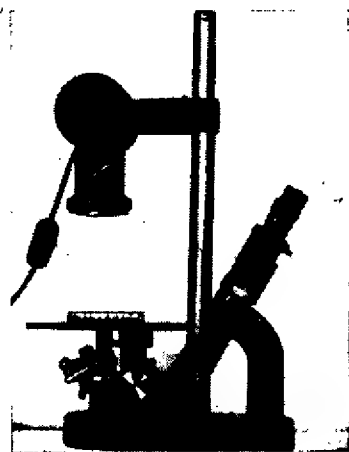


Рис. 3.7. Инвертированный микроскоп с пластинкой на столике.

меньшие объемы компонентов. Ниже приводится методика культивирования, которую можно видоизменить в зависимости от поставленной задачи.

А. СРЕДЫ

1. Ростовая среда

Для роста клеток в микрополищашках используется такая же среда, как и для роста клеток в стеклянных флаконах. Мы пришли к заключению, что для роста любых клеток трех основных типов пригодна так называемая «универсальная» среда. Состав этой питательной среды (100 мл) приводится ниже:

Основная среда Игла [11] в сбалансированном солевом растворе Эрла [12]	80,0	мл
Триптозно-фосфатный бульон Телячья (или эмбриональная) сыворотка	4,0	мл
NaHCO ₃ (7,5%)	10,0	мл
Смесь пенициллина и стрептомицина (200 ед./мл или 200 мкг/мл) ¹	1,8	мл
Неомицин (100 мкг/мл) ¹	0,2	мл
Амфотерицин В (5 мкг/мл) ¹	0,1	мл
Сбалансированный солевой раствор Эрла	0,05	мл
pH 7,0—7,2	До 100	мл

¹ Конечные концентрации. — Прим. перев.

Телячья сыворотка необходима для прикрепления и распластывания клеток по поверхности пластика. Ее минимальная концентрация варьирует для разных клеточных линий. Сыворотка должна быть предварительно проверена на присутствие специфических и неспецифических ингибиторов вирусов. (Сыворотку, лишенную ингибиторов, производит Hyland Laboratories, Los Angeles, Calif.)

2. Поддерживающая среда

Образовавшийся монослой можно сохранить в течение некоторого времени, заменив среду для роста клеток поддерживающей средой. При смене среды сильным и быстрым движением руки стряхивают старую среду, а клетки осторожно промывают сбалансированным солевым раствором и добавляют поддерживающую среду.

Для сохранения жизнеспособности клеток в монослое первичных или вторичных культур используют среду 199 [13] или основную среду Игла [11]. Для других клеток пригодна «универсальная» среда (см. выше) с уменьшенным содержанием сыворотки (2—5%). Кроме того, в поддерживающей среде рекомендуется слегка повысить pH до 7,3—7,4. Ряд исследователей [15, 16] в каче-

стве поддерживающей среды для клеток, культивируемых в микроашках, используют среду L-15 [14]. При культивировании на этой среде возможен свободный обмен газов с атмосферой, так как источником энергии в этой среде служит не глюкоза, а галактоза, в результате чего процессы метаболизма в клетках протекают медленнее и образуется меньшее количество CO_2 .

3. Разбавитель

Для разбавления сыворотки или вируса может быть выбрана любая из обычно употребляемых сред. Однако, поскольку она составляет 30—50% общего объема среды для роста клеток, ее состав должен быть совместим с составом последней. Состав стандартного разбавителя (100 мл), используемого нами, следующий:

Гидролизат лактальбумина (0,5%) в сбалансированном солевом растворе Эрла (ГЛЭ)	95,5 мл
NaHCO_3 (7,5%)	1,0 мл
Пенициллин и стрептомицин (200 ед./мл или 200 мкг/мл) ¹	0,2 мл
Неомицин (100 мкг/мл) ¹	0,1 мл
Амфотерицин В (5 мкг/мл) ¹	0,05 мл
ГЛЭ	До 100 мл
pH 7,0	

¹ Конечные концентрации. — Прим. перев.

Б. ПОДГОТОВКА КЛЕТОК

Подготовка клеток для культивирования в микроашках показана на рис. 3.8. Суспензию клеток для посева получают путем трипсинизации органов или из запасной культуры клеток, растущих в сосудах. Клетки диплоидных штаммов диспергируют следами трипсина [18]. Для получения клеточной суспензии используют также версен. В некоторых случаях достаточно сильно встряхнуть сосуд, в котором выращивают клетки. Для посева могут быть использованы также клетки, растущие в суспензии. Взятые в линейной фазе роста, они формируют монослой через 24 ч после имплантации.

Концентрация клеток для посева на микроашки такая же, как и при посеве в пробирки, но необходимый объем среды составляет лишь $\frac{1}{40}$ объема среды в про-

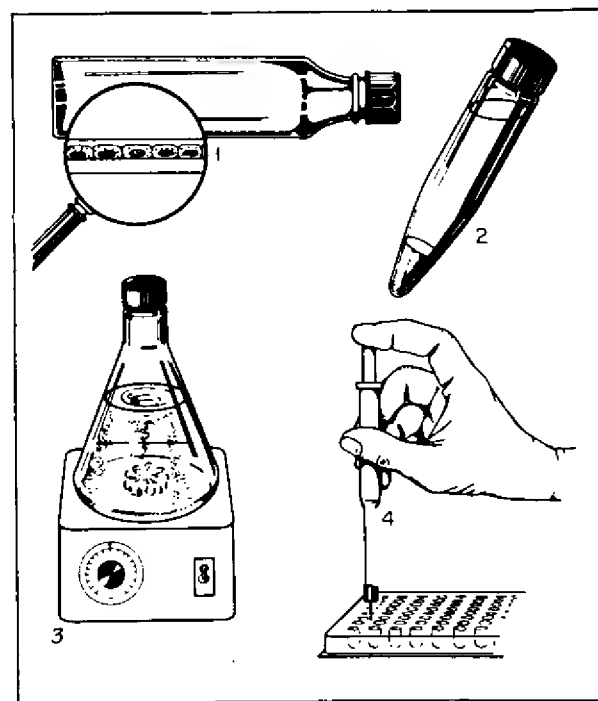


Рис. 3.8. Приготовление клеток для посева в микроашки.

1 — получение суспензии клеток трипсинизацией или другими методами; 2 — центрифугирование; 3 — ресуспендирование клеток в ростовой среде; 4 — внесение аликотов в лунки (в каждую лунку по 0,025 мл суспензии).

бирках. Концентрации клеток и среды, рекомендуемые для разных типов клеток, приведены в табл. 3.1.

Клетки, суспендированные в ростовой среде, добавляются в микроашки микропипеткой объемом 0,025 мл. При проведении различных тестов клетки добавляют после разведения исследуемого материала. Так как клет-

Условия культивирования клеток в микрочашках

Тип клеток	Концентрация клеток при посеве	Ростовая среда, pH 7,0	Время образования колоний, сут	Поддерживающая среда, pH, 7,3
Первичные культуры (клетки почек, легких, амниона и др.)	3 · 10 ⁵ клеток в 1 мл	«Универсальная» ¹ или другая подходящая среда	5—7	Основная среда Игла [11] на сбалансированном солевом растворе Эрла [12] или среда 199 [13]
Вторичные культуры (клетки легких, почек и др.)	В соотношении 2 : 1		2—3	Основная среда Игла на сбалансированном солевом растворе + 2% сыворотки (эмбриональной, телячьей)
Пересаживаемые линии (HeLa, HEp-2, KB и др.)	1 · 10 ⁵ - 2 · 10 ⁵ клеток в 1 мл		2—3	Среда Гинсберга (Ginsberg, 1955)

¹ См. среды для культивирования клеток.

ки имеют тенденцию к агрегации, их нужно разъединить, осторожно постукивая по пластинке. За диспергированием клеток следят с помощью микроскопа. Отверстия лунок закрывают либо двумя каплями масла, либо заклеивают прозрачным пластырем. Это делается для того, чтобы избежать чрезмерного испарения воды и потери CO₂ в атмосферу при инкубации в обычном бактериологическом термостате. Если имеется термостат с подачей CO₂, то пластинки просто закрывают от пыли колпаком. Повышенное содержание CO₂ в атмосфере (5%) особенно желательно при культивировании диплоидных клеток. В термостате любого типа необходима высокая относительная влажность.

Для создания атмосфер различного состава (различные комбинации и концентрации газов) можно использовать специальный герметический сосуд (Scientific Supply Co., Chicago, Ill.), показанный на рис. 3.9. Первоначально с его помощью создавали анаэробные условия для бактериальных культур, но оказалось, что он удобен и при культивировании клеток в микрочашках. Система двух клапанов в крышке дает возможность заменять газы в сосуде (из баллонов) после того, как пластинки помещены в сосуд. Когда в сосуде создается соответствующая атмосфера, его помещают в обычный термостат. Таким образом, можно легко воспроизводить разные условия для культивирования. Эта система позволила искусственно воссоздать атмосферу Марса и исследовать ее действие на рост клеток [29].

Продолжительность инкубации зависит от типа клеток. Обычно через 2—3 дня все клетки, кроме клеток

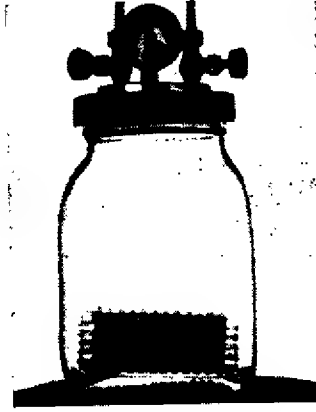


Рис. 3.9. Герметический сосуд для культивирования клеток в микрочашках в заданной атмосфере (уменьшено в 9 раз).

первичных эксплантатов, формируют монослой. Клетки первичной культуры почки обезьяны образуют монослой через 7 дней, но этот срок можно уменьшить, взяв в работу клетки второй генерации. При условии периодической смены среды культуры клеток в микрошашках, как правило, можно сохранять в течение 7—14 дней.

В. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУР

На рис. 3.10 показано, как выглядят различные типы клеток после образования ими монослоя. Эти фотографии живых клеток сделаны с помощью инвертированного микроскопа при малых увеличениях, так что в одном поле зрения видны все клетки, образующие монослой. Таким образом можно быстро оценить общее состояние каждой культуры. По своей морфологии клетки не отличаются от тех, которые растут в пробирках. Наличие гроздьев клеток свидетельствует о том, что клетки были плохо диспергированы. Появление гроздьев из округлых и пикнотических клеток может быть также результатом токсичности либо самой пластинки, либо какого-нибудь компонента системы.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В МИКРОЧАШКАХ

Наиболее широко такие культуры используются в вирусологических исследованиях для идентификации вирусов и для определения в сыворотке вирусных антител. Многие из этих методов применяются в эпидемиологических исследованиях вируса полиомиелита [7, 8, 19, 20], реовирусов [15], вируса коксеки [21], риновирусов [22, 23], вирусов парагриппа и гриппа [24—26], краснухи [27, 28], осповакцины [24] и аденовирусов [30, 31]. Некоторые исследователи сравнивали результаты, полученные с помощью микро- и макросистем. Во всех случаях результаты вполне согласуются друг с другом, и все авторы указывают на огромные преимущества микросистем при массовых серологических исследованиях.

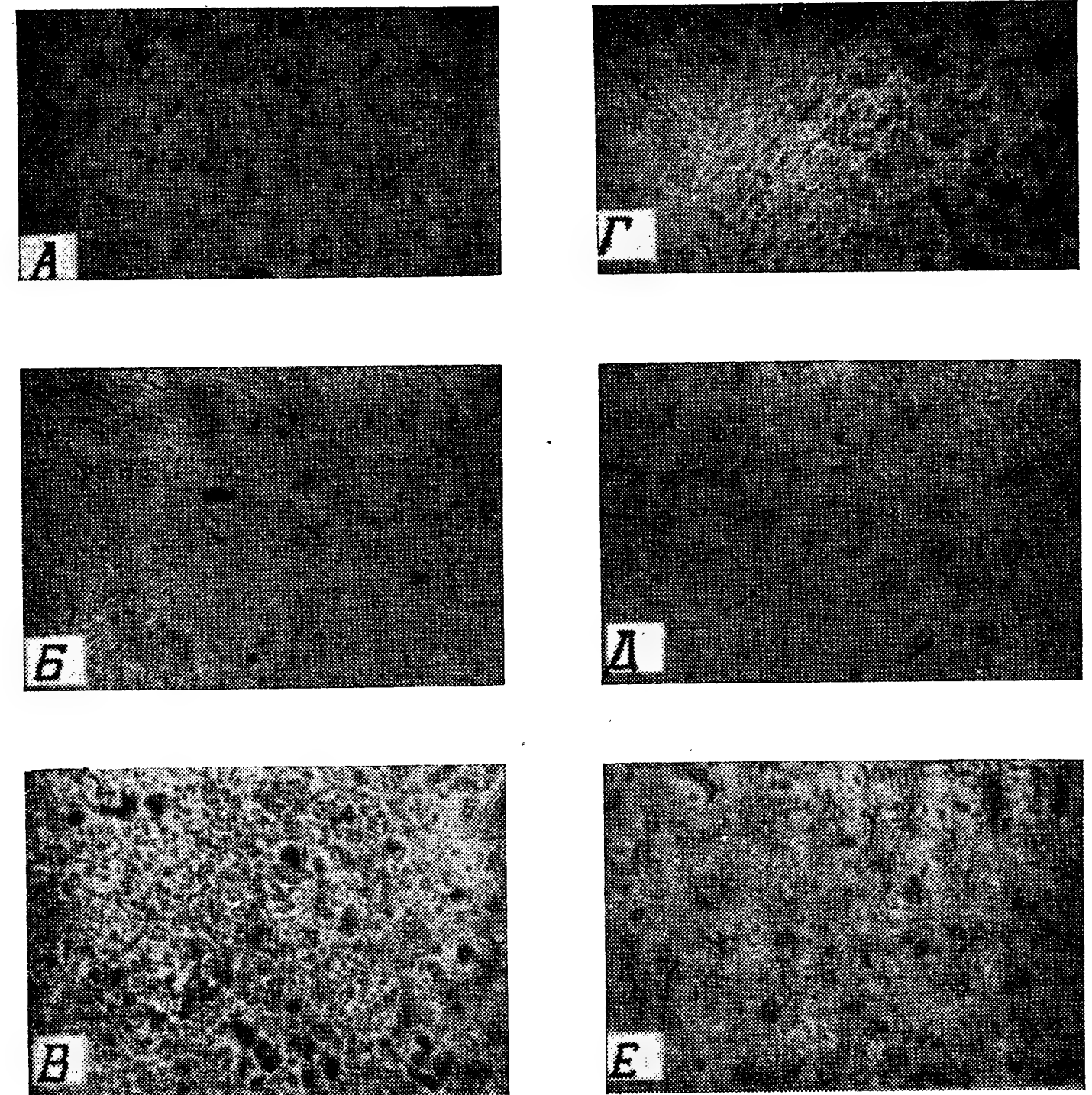


Рис. 3.10. Морфология неокрашенных монослоев, образованных различными клетками при культивировании их в микрошашках (17×) [9].

А. Эпителиоидные клетки человека (HeLa). Б. Диплоидные клетки легких человека (WI-38). В. Эпителиоидные клетки человека (KB). Г. Эпителиоидные клетки человека (HEp-2). Д. Клетки вторичных культур почки обезьяны. Е. Клетки почки кролика (RK-13).

А. ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

Многие вирусологические тесты можно проводить в микрошашках, причем клеточную суспензию (ее получают из монослоя) добавляют либо сразу же после разбавления вируса, либо после предварительной инкубации смеси сыворотка — вирус. Этим система отличается от других, в которых исследуемый материал добавляет-

ся к клеткам сформированного монослоя. Часто методика с использованием клеток сформированного монослоя оказывается невыгодной, поскольку требует больше времени, смены питательной среды и отмывки перед проведением теста. Кроме того, не используется основное преимущество микросистемы, так как при вращении петли повреждается клеточный пласт; в связи с этим разведения приходится делать в пустой пластинке, а затем уже переносить в пластинку с культурами. Тем не менее, если все же необходимо работать с монослоем клеток, то микрометоды значительно экономичнее макрометода, проводимого в пробирках.

В табл. 3.2. представлена схема опыта по титрованию инфекционности вируса и определению сывороточных антител в реакции нейтрализации. В таблице указан объем разбавителя для двукратных разведений; можно применять и большие объемы при условии, что после разведения количество питательных веществ для роста клеток будет достаточным.

Титрование вируса или сыворотки и типичная реакция нейтрализации схематически показаны на рис. 3.11. С помощью микропипетки в серию лунок на пластинке добавляется по одной капле растворителя (0,025 мл). Число таких лунок зависит от предполагаемого титра исследуемого материала. С помощью петли исследуемый материал (вирус или сыворотка) вводится в первую лунку. Перемешивание материала осуществляется вращением петли пять или более раз. Разбавленный материал (0,025 мл) петлей переносится из первой лунки во вторую и т. д.

Для проведения реакции нейтрализации к каждому разведению сыворотки прибавляют микропипеткой одну каплю определенной дозы вируса и, осторожно постукивая пластинки кончиком пальца, перемешивают. Смесь сыворотки с вирусом инкубируют в течение соответствующего периода времени и затем в каждую лунку добавляют одну каплю суспензии клеток и постукиванием пластинки диспергируют клетки. Каждый тест должен включать соответствующие контроли, такие, как клеточный контроль, контроль дозы вируса и токсичности сыворотки. В лунки капают масло или заклеивают

Таблица 3.2

Схема опыта титрования вируса или реакции нейтрализации в микросистеме

Определение инфекционности вируса

Последовательность процедур	Разбавитель	Вирус	Тестирование	Суспензия клеток (в ростовой среде)	Дополнительный разбавитель (не обязательно)	Условия инкубации	
						обычная атмосфера	атмосфера с CO ₂
Объем, мл	0,025	0,025	Микротитрование	0,025	0,025	Капают масло (0,1 мл) или заклеивают пластырем	Закрывают крышкой

Реакция нейтрализации

Последовательность процедур	Разбавитель	Сыворотка или ингибитор	Тестирование	Доза вируса (10 ⁻¹⁰⁰ MTCD ₅₀)	Процедура	Суспензия клеток в ростовой среде	Условия инкубации
Объем, мл	0,025	0,025	Микротитрование	0,025	Смешивают реagenty; пластинку закрывают крышкой, инкубируют 30—120 мин	0,025	Такие же, как при определении инфекционности вируса

Н. В. Необходимы соответствующие контроли, т. е. клеточный, дозы вируса и сыворотки. Опыт проводят в общем термостате или в термостате с CO₂ 3—7 дней.

Результаты регистрируют по степени патологических изменений в клетках или по подавлению метаболизма.

1 MTCD₅₀— доза, предварительно установленная с помощью микроташек.

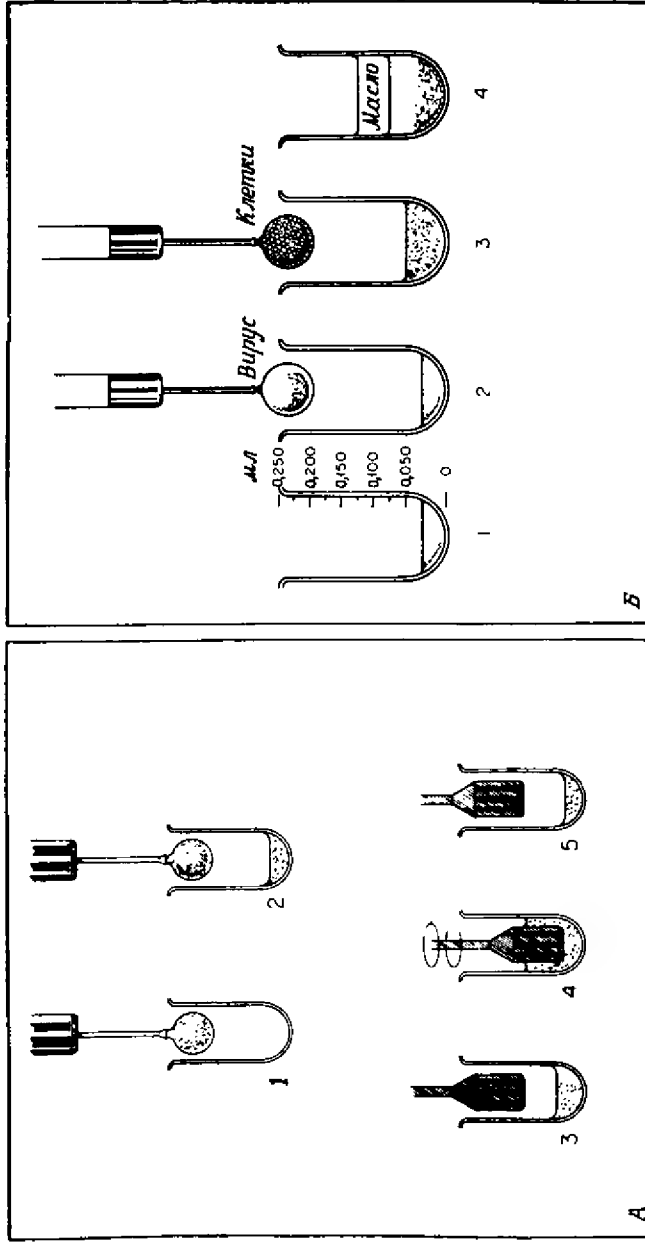


Рис. 3.11. А. Техника микротитрования вируса или сыворотки (двухкратные разведения). 1 — добавление разбавителя (0,025 мл); 2 — добавление вируса или сыворотки (0,025 мл); 3 — внесение клеток; 4 — инкубация; 5 — чтение. Б. Постановка реакции нейтрализации. 1 — разбавление сыворотки (0,025 мл), перемешивание, инкубирование в течение 30 мин — 2 ч; 3 — добавление клеток (0,025 мл), перемешивание, инкубирование в течение 2—3 сут; 4 — образование монослоя. Выявление цитопатологии.

их пластирем и инкубируют либо в течение определенного периода времени, либо ориентируются по контрольной дозе вируса.

Обычно реакцию нейтрализации осуществляют титрованием сыворотки определенной дозой вируса; реже пользуются другим методом — титрованием последовательных разведений вируса постоянным объемом сыворотки. Любой из этих методов пригоден для проведения реакции нейтрализации в микросистеме.

Если это необходимо, то на одной пластинке можно одновременно поставить 2 опыта: с разведением сыворотки и с разведением вируса (шахматное титрование). Такой метод удобен для определения оптимальных соотношений антигена и антисыворотки.

Пластинки также удобны для определения количества вируса, оставшегося после реакции нейтрализации (рис. 3.12). В этом случае смесь вируса и антисыворотки инкубируют с клетками, причем опыт ставят лишь на части пластинки. Через определенный промежуток времени просматривают инкубируемые клетки для определения степени цитопатического эффекта (ненейтрализованный вирус). В неиспользованные на пластинке лунки добавляют разбавитель и ранее инфицированные культуры. Петлей готовят разведения, а затем в лунки добавляют клетки свежих культур. Пластинку снова инкубируют, после чего определяют количество живого вируса, оставшегося после нейтрализации. Такой метод является более чувствительным и более количественным, чем общепринятая реакция нейтрализации. Особенно рекомендуется применять его при анализе интерферона, когда количество активного материала очень мало.

Результаты выделения вируса из клинического материала с помощью микрочашек хорошо согласуются с результатами выделения его в пробирках (неопубликованные данные). Определенные сложности возникают в связи с токсичностью таких проб, но в большинстве случаев эти сложности можно преодолеть, подбирая соответствующие среды для получения проб, повторно добавляя клеточную суспензию через 24 ч после инокуляции или пересевая культуры.

Выделение вируса проводят в стерильных пластинках, имеющих лунки с плоским или U-образным дном. В каждую лунку добавляют по 1 капле разбавителя, 2 капли пробы и 1 капле клеточной суспензии. Количество пробы в 8 углублениях обычно равноценно инокуле для 2 пробирок с клеточными культурами. Ряды с ис-

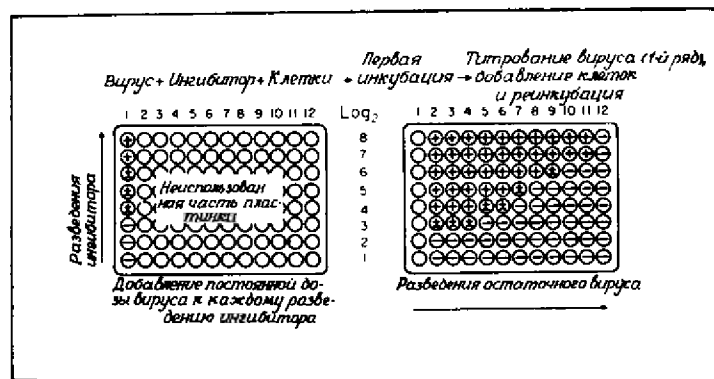


Рис. 3.12. Техника тестирования остаточного вируса на одной пластинке.

Разрушение вируса: + полное; ± частичное; — отсутствует.

следуемым материалом чередуют с рядами контрольного материала, так что на пластинке получается 6 контрольных и 6 опытных рядов. Пластинки закрывают стерильной пластиковой крышкой (Linbro) и инкубируют в термостате, атмосфера которого хорошо увлажнена и содержит повышенное количество CO_2 (1—2%) для поддержания необходимой величины pH. Если через 24 ч при микроскопическом исследовании обнаруживается токсическое действие на клетки, то снова добавляют 1 каплю клеточной суспензии. Эти клетки будут расти вместо тех, которые разрушены токсическими веществами. При длительном сохранении токсичности рекомендуется пересев клеток. Пластинки инкубируют 6—8 дней без смены среды и периодически просматривают для определения цитопатического эффекта. При

пересеве клеточный пласт в лунках разрушают кончиком микропипетки и содержимое всех лунок собирают вместе. В лунки на новой пластинке к 1 капле разбавителя добавляют по 2 капли полученной суспензии. Эти новые пластинки инкубируют при прежних условиях. Оставшиеся клетки можно заморозить и использовать позднее. Для идентификации проб, в которых наблюдается цитопатический эффект 4+, в микрокашши добавляют по 1 капле пробы и 1 капле специфической антисыворотки; смесь инкубируют не менее 1 ч при 35°C. Затем добавляют клетки и пластинки реинкубируют в течение 2—7 дней.

При работе с пластинками следует тщательно соблюдать меры предосторожности. Если содержимое лунок из-за неумелого обращения расплескается, то может произойти перекрестное заражение. Ясно также, что в таких условиях неосторожное обращение с пробами, содержащими неизвестные агенты, может быть опасным и для самого работающего.

К настоящему времени с использованием первичных, полупостоянных (диплоидные клетки легких) и постоянных культур этим методом выделены аденовирусы, вирусы полиомйелита, герпеса, гриппа и ЕСНО.

Этот метод не применим в тех случаях, когда необходимы особые условия культивирования, как, например, выращивание пробирок для выделения риновируса.

К числу явных достоинств такого метода выделения относится также то, что цитопатический эффект часто обнаруживается раньше, и поэтому для идентификации вируса требуется от 4 до 6 сут.

Б. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство вирусологических тестов на культурах, выращиваемых в пробирках, основано на исследовании патологических изменений в клетках, торможении клеточного метаболизма, агглютинации эритроцитов или на применении специфических красителей, которые свидетельствуют о размножении вируса или его подавлении. Результаты оцениваются либо микро- или макро-скопическим изучением клеток, либо по изменениям со-

ответствующих индикаторов. Этими же методами оценки результатов можно пользоваться и при работе с микросистемами.

1. Патологические изменения в клетках

Дегенерацию неокрашенных живых клеток, вызванную вирусом, можно наблюдать в инвертированном микроскопе. При малых увеличениях (35×) клеточный

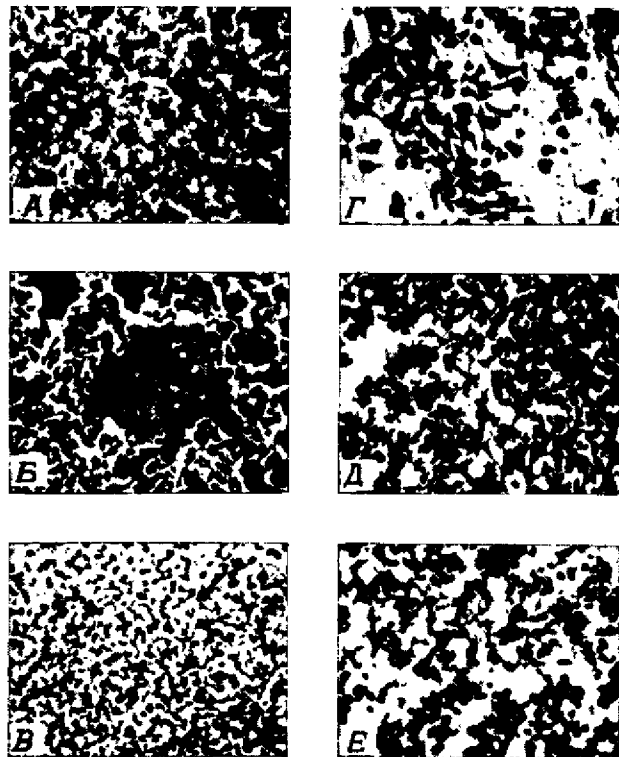


Рис. 3.13. Морфология интактных и инфицированных вирусом клеток НЕр-2, культивируемых в микрокашках; окрашивание гематоксилин-эозином (20×).

А. Неинфицированные клетки. Б. Респираторный синцитиальный вирус. В. Вирус полиомиелита, тип. 3. Г. Вирус герпеса. Д. Вирус осповакцины. Е. Аденовирус, тип. 7.

монослой виден целиком. Это позволяет наблюдателю быстро произвести полную оценку, тогда как при работе с культурами в пробирках нужно исследовать по

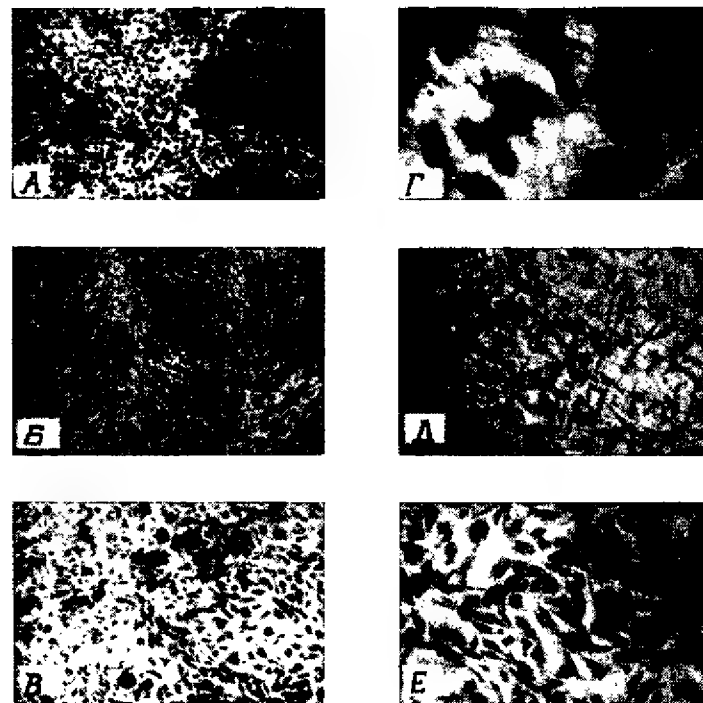


Рис. 3.14. Монослой окрашенных клеток, культивируемых в микрокашках, при разных увеличениях.

Все фотографии уменьшены вдвое при воспроизведении [9].
А. Почки обезьяны (окрашивание раствором Май-Грюнвальд; 35×). Б. Диплоидные клетки легких человека (окрашивание по Райту; 35×). В. Эмбриональная почка человека (окрашивание раствором Май-Грюнвальд; 100×). Г. Почки обезьяны (окрашивание раствором Май-Грюнвальд; 500×). Д. Диплоидные клетки легких человека (окрашивание по Райту; 100×). Е. Эмбриональная почка человека (окрашивание раствором Май-Грюнвальд; 200×).

несколько полей зрения. Кроме того, двигая пластинки по столику микроскопа, легко сравнить результаты контроля и опыта. Таким образом, исследователь может немедленно, пока в памяти еще свежи зрительные изобра-

жения, оценивать относительное количество разрушенных клеток в двух лунках. Следовательно, оценка результатов, полученных на клеточных культурах в пластинках, менее утомительна и менее субъективна, чем при обычных методах. Пользуясь большими увеличениями, легко различить характер дегенерации клеток,

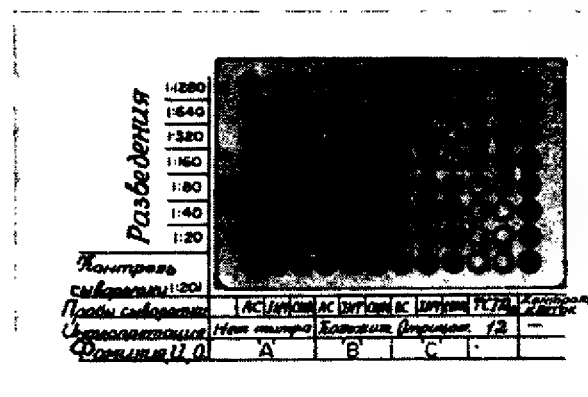


Рис. 3.15. Макроскопическая оценка окрашенного клеточного моно- слоя после реакции нейтрализации вируса.

Фотография уменьшена в 3 раза при воспроизведении [9].

вызванный различными группами вирусов. Различные типы патологических изменений в клетках показаны на рис. 3.13.

Клетки можно зафиксировать (фиксатором, который не растворяет пластик) и окрасить непосредственно в лунках (рис. 3.14). Таким образом, возможна либо микроскопическая оценка результатов, либо макроскопическая оценка всего клеточного пласта (рис. 3.15).

2. Метод подавления обмена (колориметрический тест)

Пожалуй, самым простым способом оценки результатов опыта является тест на подавление метаболизма [2—4]. Им легко пользоваться применительно к системе микротитрования [2, 23]. Рис. 3.16 иллюстрирует

тест на подавление метаболизма риновирусом. Для проведения таких тестов Леннет и др. [4] разработали специальную среду, хотя можно пользоваться и обычной средой, состав которой указан выше. Недостаток теста на подавление метаболизма заключается в том, что для

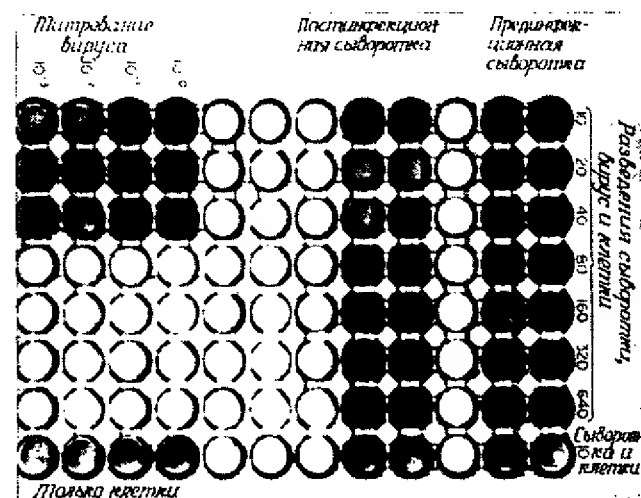


Рис. 3.16. Реакция подавления обмена при определении инфекционности риновируса и нейтрализующих свойств сыворотки (темные чашки указывают на подавление обмена) [23].

выявления четких различий в цвете требуется длительный период инкубации. Кроме того, изменения в цвете, вызываемые многими вирусами, трудно различить. Непосредственное же микроскопическое исследование клеток в микрочашках осуществляется очень быстро и выявляет тонкие изменения в морфологии клеток, неразличимые грубым колориметрическим наблюдением.

В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНА

Определение интерферона можно проводить в микросистеме [16], причем осуществляется это примерно так же, как в культурах в пробирках. Опишем этот ме-

тод в нескольких словах. Исследуемой жидкостью покрывают клеточный монослой. Культуры инкубируют 24 ч, затем жидкость сливают и клетки заражают определенной дозой интерферон-чувствительного вируса (Синдбис, ЕСНО-11). Значительное подавление вирусной инфекции указывает на присутствие интерферона или интерферон-подобных веществ.

Г. ТОРМОЖЕНИЕ ГЕМАДСОРБЦИИ

Некоторые вирусы, такие, например, как миксовирусы, при размножении либо совсем не повреждают клетки, либо повреждают их очень незначительно. Фогель и Шелеков [32] разработали метод, в основе которого лежит явление гемадсорбции. К клеткам, инфицированным вирусом, добавляют суспензию эритроцитов, а затем проводят микроскопическое исследование этих культур. Показано [24, 33], что такая методика в ее микроварианте применима для титрования вирусов группы гриппа и парагриппа. Вульф и др. [25] предложили макроскопическую технику для оценки таких тестов. Мы также использовали макроскопический метод при исследовании миксовирусов и считаем, что полученные результаты вполне согласуются с результатами более сложной микроскопической процедуры. Результаты микро- и макроскопических исследований гемадсорбции, вызванной вирусом, показаны на рис. 3.17 и 3.18 соответственно.

Метод «нейтрализации» миксовирусов или других вызывающих гемадсорбцию вирусов следующий. Смесь вируса и сыворотки предварительно инкубируют в лунках пластинки, затем к этой смеси добавляют клетки вторичных культур почки обезьяны и инкубируют при 36 °C в течение 3–5 суток. Жидкость удаляют декантированием и в каждую лунку добавляют по одной капле (0,025 мл) 0,2%-ной суспензии куриных эритроцитов или эритроцитов морской свинки. Пластинку инкубируют при 4 °C в течение 20 мин.

После инкубации пластинки снова помещают при комнатной температуре почти в вертикальном положении и определяют, когда в контрольных культурах (без

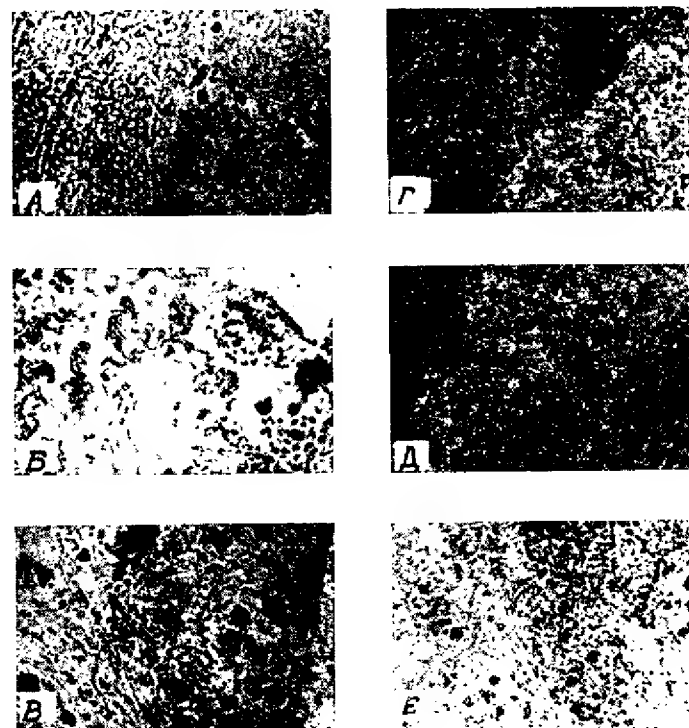


Рис. 3.17. Микроскопическое исследование реакции гемадсорбции, вызванной разными вирусами, на культивируемых в микрочашках клетках из почки обезьяны [19].

А. Неинфицированные контрольные клетки (100X). Б. Вирус осповакцины и куриные эритроциты (100X). В. Вирус парагриппа, тип 1, и эритроциты морской свинки (100X). Г. Вирус осповакцины и куриные эритроциты (50X). Д. Вирус гриппа (A₂/Jarvis/1957) и эритроциты морской свинки (50X). Е. Вирус парагриппа, тип 3, и эритроциты морской свинки (50X). Все фотографии уменьшены вдвое при воспроизведении.

вируса) происходит «сползание» эритроцитов (обычно через 10–30 мин). В культурах, в которых большая часть вируса не адсорбировалась, также обнаруживается «сползание» эритроцитов, что указывает на торможение размножения вируса. В культурах, в которых

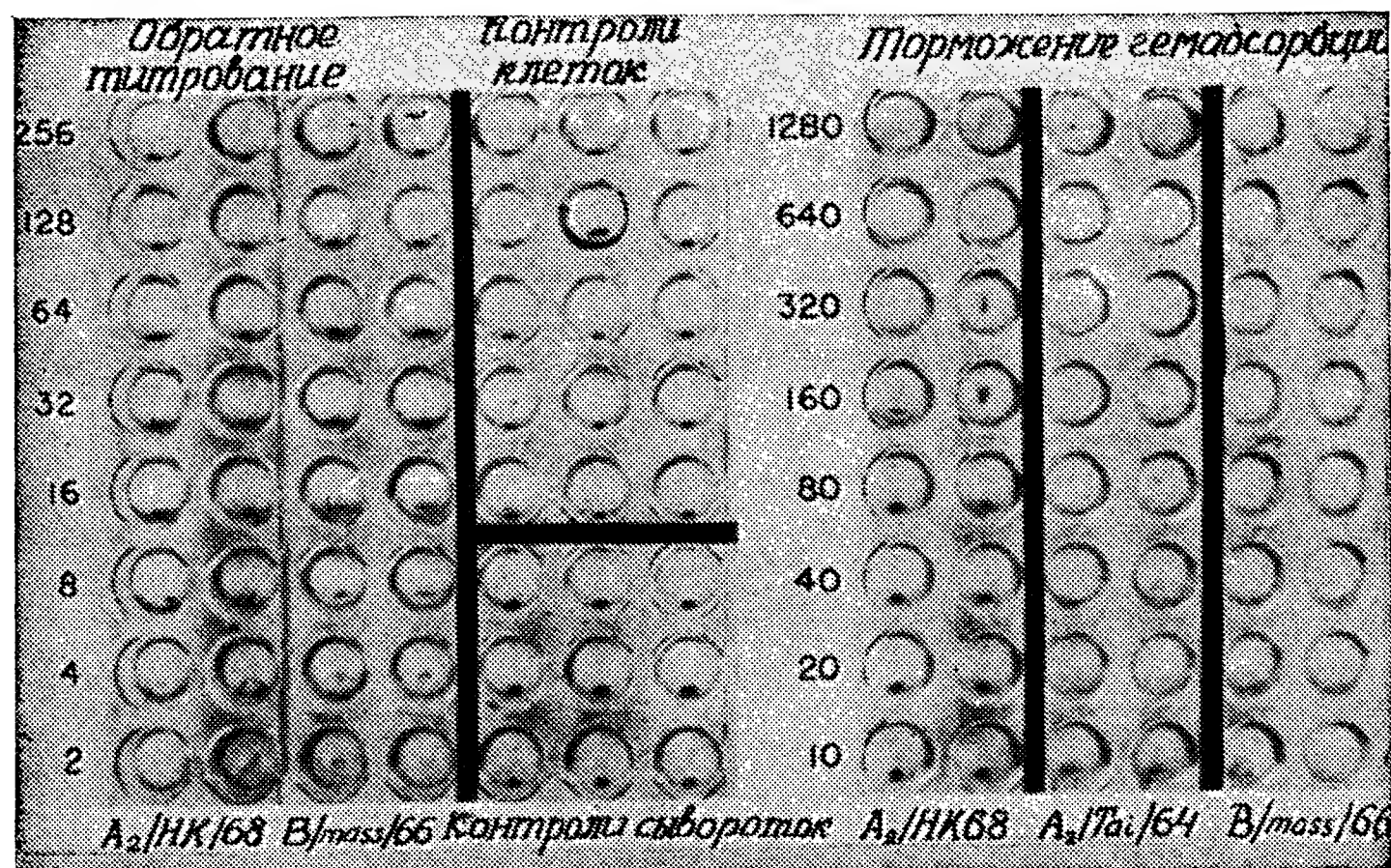


Рис. 3.18. Макроскопическая оценка титрования реакции гемадсорбции вирусов гриппа $A_2/HK/68$ и $B/Mass/66$ (левая пластинка) и титрование $A_2/HK/68$ с помощью гипериммунной куриной сыворотки (правая пластинка).

Лунки с «пуговками» эритроцитов указывают на отсутствие гемадсорбции. Торможение его типоспецифической иммунной сывороткой показано на правой пластинке.

нейтрализация вируса не происходит, эритроциты адсорбируются клеточным монослоем (рис. 3.18). Для обнаружения вирусов можно проводить и более чувствительное микроскопическое исследование, однако как оценка, так и подготовка материала для микроскопии более трудоемки.

Д. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для клеток, культивируемых на пластинках, применимы почти все обычные методы окрашивания при условии, что фиксатор не растворяет пластик, как, например, ацетон. Прекрасные результаты получают при использовании спирта, формалина, четырехоксида осмия, а также жидкостей Карнуа и Буэна. Окрашивать клетки можно метиленовым синим, метиловым фиолетовым.

гематоксилином и эозином, растворами Гимза, Райта и Май-Грюнвальд, а также реактивом Фельгена (рис. 3.14).

Фиксацию, окрашивание и отмывку проводят прямо на пластинках, что дает возможность сэкономить посуду и свести к минимуму потери реактивов. В процессе окрашивания клетки обычно обезвоживаются. Для того чтобы они восстановили нормальную форму, к ним добавляют каплю масла. Окрашенные клетки можно исследовать с помощью простого микроскопа, положив пластинку на столик микроскопа вверх дном. В тех случаях, когда исследование ведут при больших увеличениях, иммерсионное масло капают на наружную поверхность пластинки.

Внутриклеточную структуру исследуют с помощью сухих или иммерсионных объективов. Для работы при больших увеличениях рекомендуется использовать пластинки с лунками, имеющими плоское дно, поскольку это уменьшает периферические искажения.

Е. ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА

Микроскопическую технику с успехом применяют для работы с флуоресцирующими антителами (рис. 3.19) и неконъюгирующими флуоресцирующими красителями, например с акридиновым оранжевым и корифосфином-О.

При работе с темнопольным конденсором между конденсором и исследуемым материалом должно находиться масло, поэтому часто целые пластинки использовать нельзя. В таких случаях пробойником для пробок, диаметр которого несколько меньше диаметра углубления, можно вырезать дно пластинки (пластинка из мягкого пластика) с окрашенными клетками. Чтобы получить ровные диски, следует предварительно осторожно нагреть пластинку. Диск помещают на предметное стекло как покровное. Для исследования тонкой структуры клетки, когда работают при больших увеличениях микроскопа, толщина пластинок должна быть меньше 1 мм.

Ж. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Розенбаум и др. [34] разработали метод, который позволяет применять клеточные культуры, выращиваемые в микрочашках для электронноскопических исследований. Мы не будем подробно останавливаться на вы-

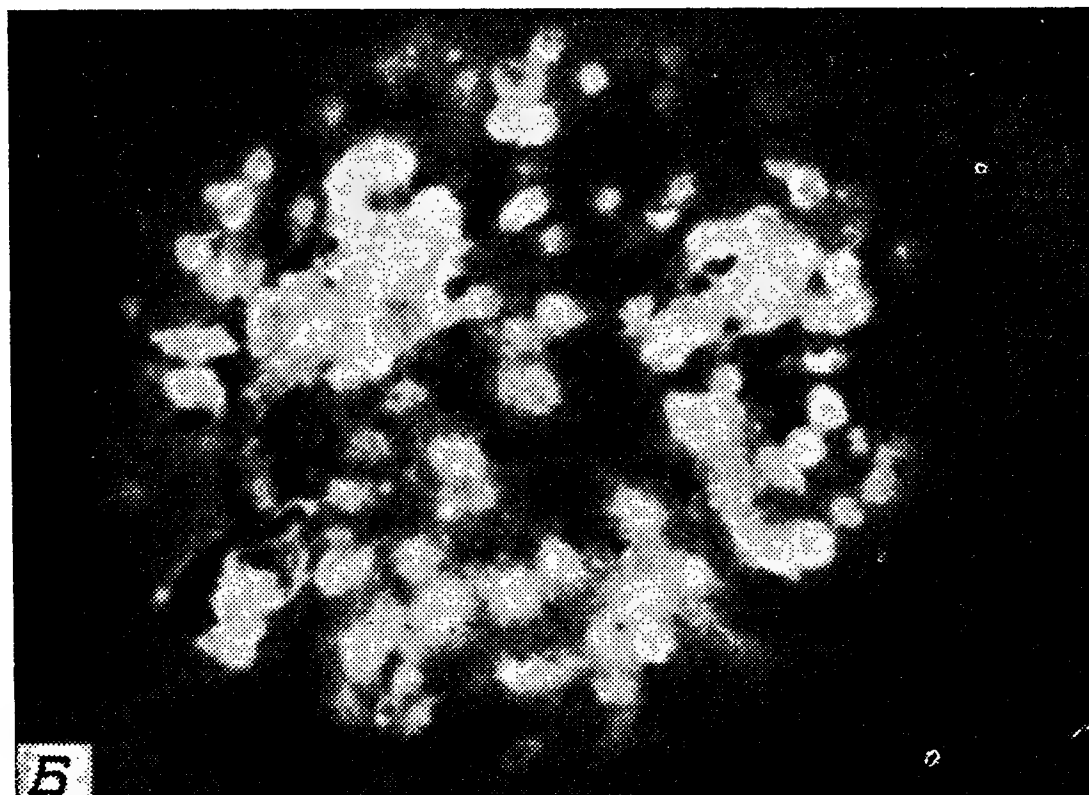
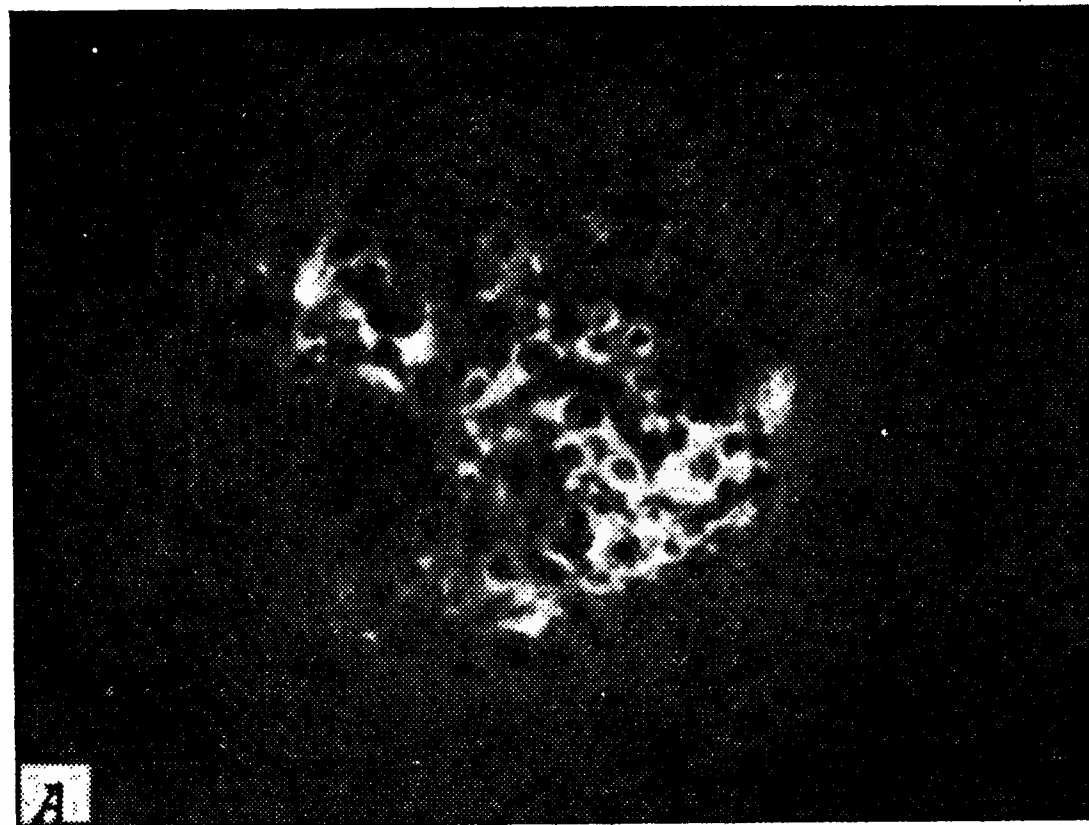


Рис. 3.19. Нормальные (А) и инфицированные (Б) культуры клеток почки обезьяны, окрашенные флуоресцирующими антителами, специфичными в отношении вируса гриппа A₂/HongKong/1968 (266 X).

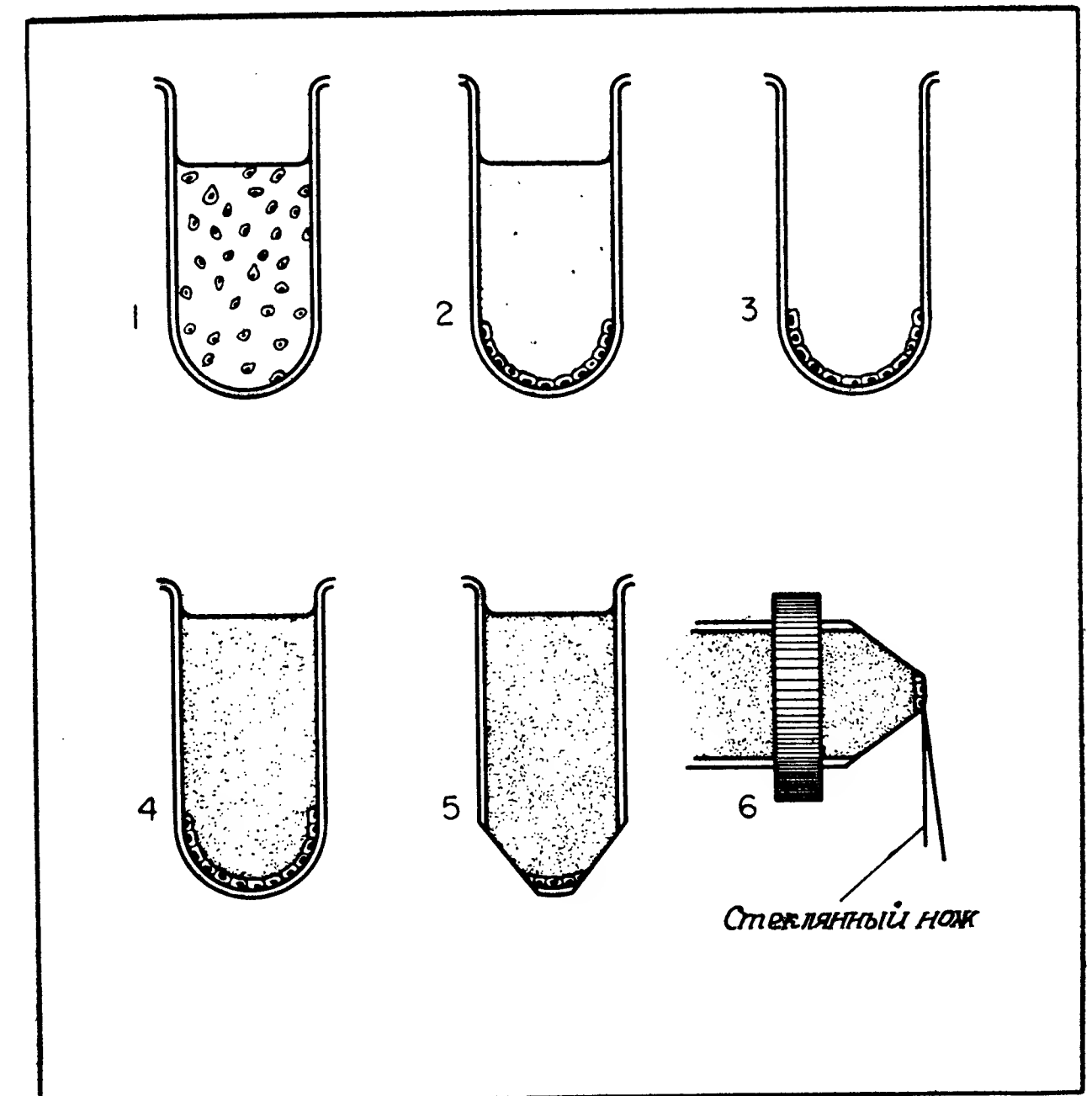


Рис. 3.20. Подготовка клеток, культивируемых в микрочашках для заливки и последующей резки на ультратоме [34].

1 — посев и инкубация клеток в течение 72 ч при 36 °C; 2 — образование моно-
слоя; 3 — фиксация и обезвоживание; 4 — заливка и инкубация в течение 48 ч
при 60 °C; 5 — заточка блока; 6 — установка на столике и резка.

боре фиксатора, приготовления сред для заливки, степени их твердости и т. д. Все это зависит от целей эксперимента и привычки экспериментатора. Укажем лишь, насколько применение микрочашек облегчает такие процедуры (рис. 3.20).

Как правило, получение клеточного монослоя для приготовления ультратонких срезов является чрезвычайно кропотливым процессом. Клетки обычно выращивают в пробирках на покровных стеклах, затем перед фиксацией, обезвоживанием и заливкой снимают с поверхности покровного стекла и переносят в пластиковую

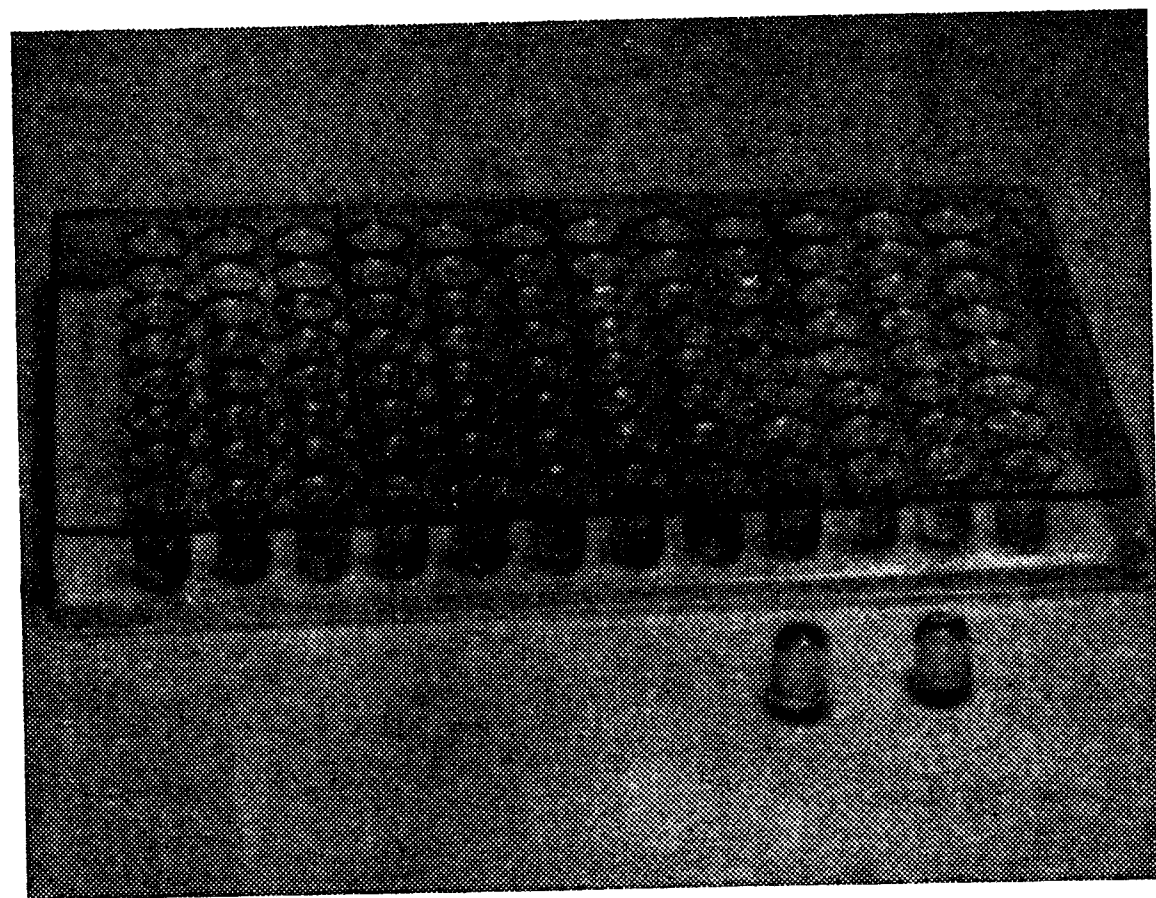


Рис. 3.21. Так выглядят микрошашки с культурой клеток, залитые полиакриламидной смолой, которая полимеризовалась с образованием твердого блока для получения ультратонких срезов [34].

капсулу. Весь этот процесс, вплоть до подготовки блока к резке, можно выполнить в лунках, если клетки выращивают в микрошашках (рис. 3.21). Такой метод позволяет исключить многие предварительные этапы и, кроме того, дает большое число образцов. Приведем краткое описание метода. После того, как клетки образуют монослой, из лунок сливают среду и клетки промывают несколько раз 0,01 М солевым фосфатным буфером (рН 7,0). Фиксацию проводят под хорошо вентилируемым колпаком. Пластинку переворачивают вверх дном и кладут на крышку, на которую помещают фильтровальную бумагу, насыщенную 2%-ной четырехокисью осмия. Пластинку с клетками держат в парах фиксато-

ра 15 мин. Фиксированные клетки споласкивают водой и обезвоживают возрастающими концентрациями этилового спирта (50, 70, 90 и 100%, по 2 мин в каждой). Пластинки высушивают на воздухе и заполняют лунки заливочной средой (эпон или аралдит); полимеризацию проводят при 60°C в течение 48 ч. Лунки с затвердев-

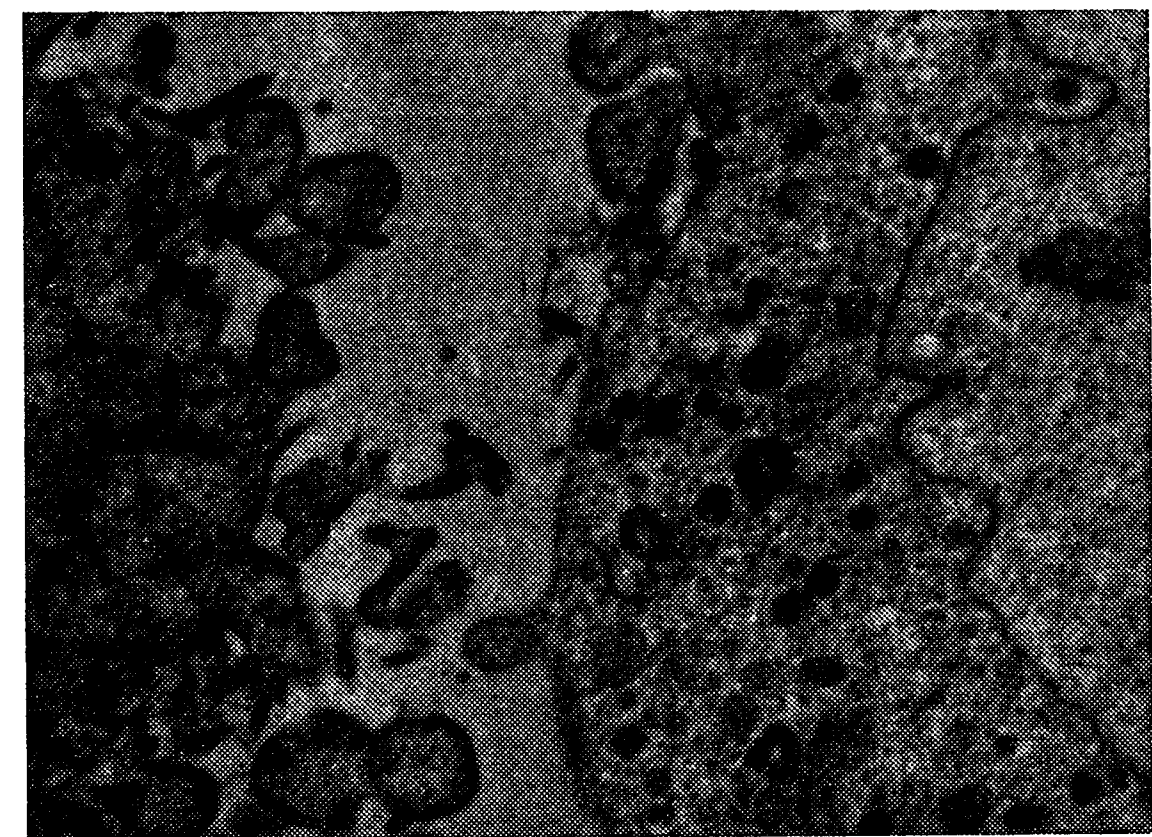


Рис. 3.22. Электронная микрофотография ультратонкого среза клеток НЕР-2, выросших, фиксированных и залитых в микрошашках ($\times \sim 9350$). [34].

шим материалом вырезают из пластинки, делают на них длинный разрез и снимают пластиковый кожух (эту последнюю операцию можно опустить). Блок затачивают, закрепляют в микротоме (форма готового блока должна соответствовать держателю) и режут. Поскольку толщина образца в блоке равна обычно толщине монослоя клеток и эти клетки ориентированы в блоке одинаково, необходимо, чтобы поверхность блока была правильно установлена относительно края ножа, иначе будет получаться много пустых срезов. Опытный экспериментатор может приготовить достаточное количество хороших срезов (рис. 3.22).

3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОМЕТОДА В ФАРМАКОЛОГИИ

Многие вещества оказывают токсический или летальный эффект на клеточные культуры. К числу таких веществ относятся продукты биологического происхождения, например токсины, а также различные лекарственные соединения. Тканевые культуры использовались для исследований токсинов грамотрицательных бактерий (Сулливан, неопубликованные данные) и возбудителей дифтерии [35]. Кроме того, на тканевых культурах изучалась токсичность васкулярных жидкостей (сыворотки и плазмы) [36, 37]. Многие антитоксины тормозят этот эффект, в связи с чем их свойства могут также изучаться с помощью культивируемых клеток [38].

Помимо всего прочего, отметим, что прежде, чем перейти к исследованиям на животных, чрезвычайно важно проверить антимикробные лекарственные вещества на токсичность и специфический эффект. Для этих целей очень удобен микрометод, с помощью которого без особых затрат можно произвести массовую проверку многих соединений в отношении их действия на разные клетки. Микросистема удобна еще и тем, что в ней легко менять условия окружающей среды: температуру, содержание того или иного газа в атмосфере, давление или состав культуральной среды.

Микротехника очень удобна для тестирования противовирусных препаратов, так как одновременно можно проверять несколько препаратов против целого ряда вирусов.

Техника проведения упомянутых выше тестов весьма сходна с техникой, описанной для титрования вирусов и проведения реакции нейтрализации.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА

Техника культивирования клеток в микрочашках пока еще не нашла своего полного применения. Ниже указаны те области биологических исследований, в которых с успехом можно использовать клеточные микрокультуры. В большинстве случаев микрометод представляет собой модификацию метода выращивания клеток в пробирках или в больших по объему сосудах.

А. ИММУНОЛОГИЯ

В микрочашках можно культивировать перевиваемые линии лейкоцитов [39]. Такие культуры пригодны для изучения образования лимфобластов, для проведения генетических сравнений, продукции интерферона, установления тканевой совместимости *in vitro* и определения свойств антилимфоцитарной сыворотки. Многие другие иммунологические тесты выполняются в микрочашках; например, можно определить совместимость по группам крови, лейкоагглютинины и лейкоцитотоксины. При постановке опыта по принципу «шахматного» титрования можно быстро провести массовый тест на тканевую совместимость. Другим примером возможного применения техники культивирования клеток в микрочашках является определение цитолитической активности комплекса невирусный антиген — антитело и роль в ней комплекса.

Б. КЛОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК

В микрочашках с помощью петли легко получить клоны клеток. Лунки, расположенные на пластинке, засевают клетками в определенной концентрации. Последовательным разбавлением клеточной суспензии можно добиться того, что в каждой лунке будет содержаться по несколько или по одной клетке, причем все разведения можно получать во многих повторностях. Наличие в лунке одной клетки проверяют с помощью микроскопа, после чего пластинки инкубируют. Потомство одной клетки переносят в больший сосуд и получают клоновую популяцию.

В. АВТОМАТИЗАЦИЯ

Наиболее перспективным применением системы для микротитрования является создание на ее основе автоматизации. Схематически такой процесс представлен на рис. 3.23. Выше уже упоминалось, что выпускаются приспособления, в которых добавление реагентов и разбавление осуществляются автоматически. Объединив такую систему с системой окрашивания клеток (рис. 3.15) и

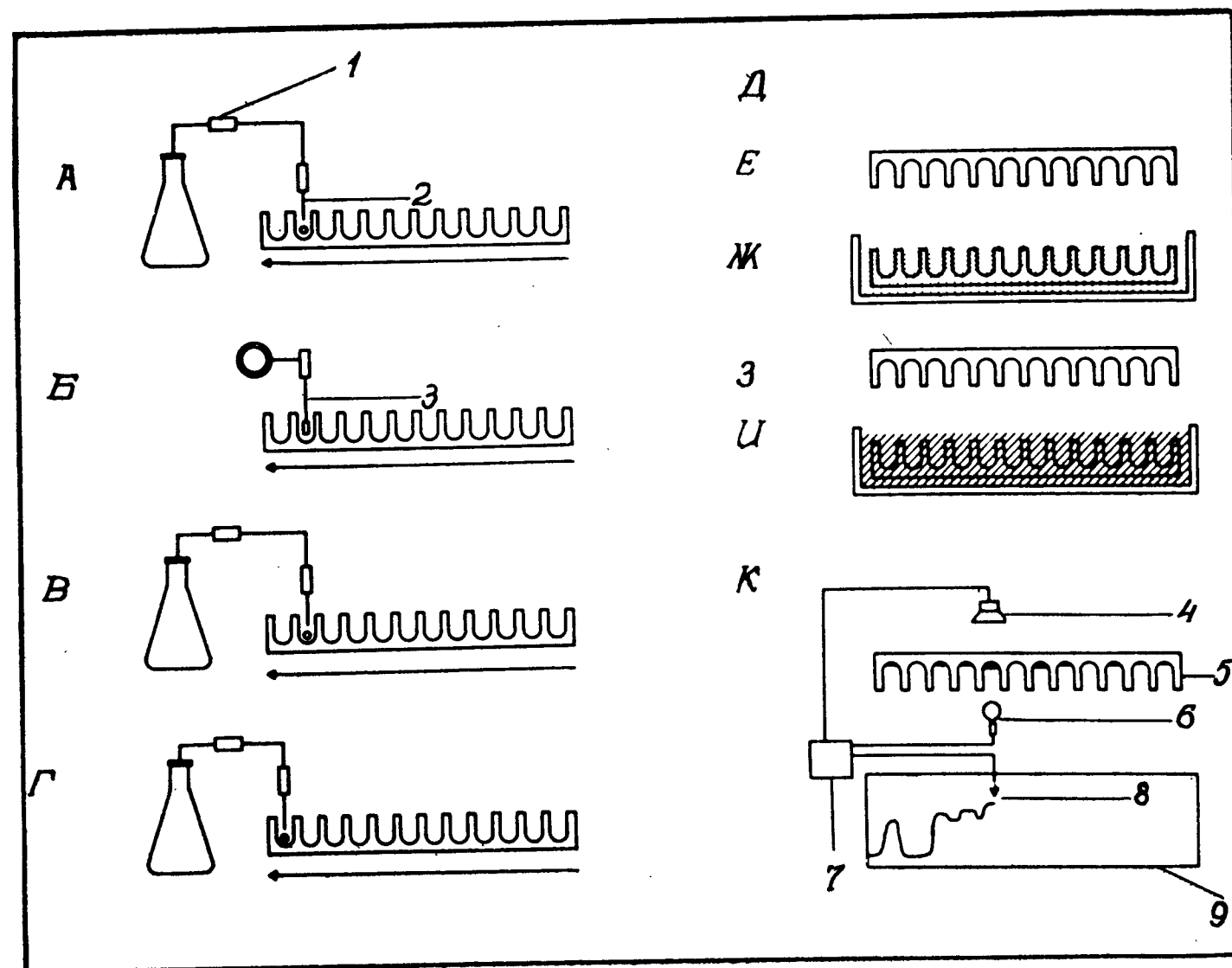


Рис. 3.23. Схема микрокультивирования тканей для автоматизированных биологических исследований.

А. Антитело. Б. Разбавление. В. Антиген. Г. Клетки. Д. Инкубирование. Е. Перевертывание пластинок. Ж. Промывка. З. Перевертывание пластинок. И. Окращивание. К. Регистрация результатов.
1 — насос; 2 — микропипетка; 3 — петля; 4 — сканирующее устройство; 5 — окрашенные клетки; 6 — свет; 7 — денситометр; 8 — самописец; 9 — записывающее устройство.

денситометром, можно получить графическое изображение результатов.

В настоящее время такая система имеет ограниченное применение, но она технически осуществима и в будущем может оказаться весьма полезной.

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ СО СПЕЦИФИКОЙ МИКРОМЕТОДА

А. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

Трудности, связанные с неспецифической цитотоксичностью, представляют собой, пожалуй, основную проблему, с которой сталкивается исследователь при культивировании клеток в микросистемах. Причины, обус-

ловливающие эту токсичность, могут быть самыми разными, однако к числу наиболее общих следует отнести качество пластинок и неизвестные факторы, присутствующие в сыворотке.

Истинная причина токсичности пластинок неизвестна, но полагают, что она связана с процессом изготовления, при котором матрицы покрывают агентом, способствующим высвобождению пластиковых форм. Этот недостаток обычно можно исправить, промыв пластинки спиртом. Если после такой обработки токсичность сохраняется, то пластинки для работы не пригодны. В таких случаях (довольно редких) токсичность, вероятно, обусловлена составом самого пластика и консультация со специалистами фирмы, выпускающей пластинки, поможет выявить причину этой токсичности.

Причины токсичности сыворотки требуют дальнейшего тщательного исследования. Такой эффект наблюдается и при культивировании клеток в пробирках, но из-за большого разбавления сыворотки он не так заметен. Если сыворотку не сразу отделяют от сгустка после коагуляции, то она более токсична (Сулливан и Розенбаум, неопубликованные данные). Замораживание свернувшейся крови вскоре после ее сбора снижает токсичность. Вместе с тем повторное замораживание и оттаивание сыворотки увеличивают токсичность. Снижают токсичность либо тепловой инактивацией (при 56°C в течение 30 мин), либо с помощью адсорбции порошками, приготовленными из тканей или органов.

Б. ДЕФЕКТЫ ПЛАСТИНОК

Пластинки с шероховатым дном не пригодны, так как любая неровность мешает образованию монослоя и затрудняет микроскопическое исследование. Такие дефекты пластинок, как правило, обусловлены дефектами форм, в которых их отливают.

В. ОПАСНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Вероятно, наиболее серьезной проблемой, о которой часто забывают, являются возможные опасные последствия при неосторожной работе с инфицированными

культурами. Небрежность в работе часто обуславливается простотой самой системы. О возможной опасности и необходимости соблюдать меры предосторожности должны быть предупреждены все, даже самые опытные работники. Прежде чем пластинки выбросить, их нужно замочить в 0,5% HCl или проавтоклавировать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на трудности, которые мы отметили выше, культивирование клеток в микрочашках удобно для разных исследований, связанных с тканевыми культурами, а также с агентами, которые в них размножаются или воздействуют на них каким-либо образом. Вероятно, существует еще много возможных сфер, где этот метод окажется весьма полезным, о которых мы не упомянули. Применение его в основном зависит от изобретательности экспериментатора. Методы, предложенные автором в этой главе, служат лишь основой для самых разнообразных модификаций в соответствии с целями и задачами исследования. Неоценимое преимущество техники микрокультивирования состоит в том, что оно освобождает исследователя от надоевшей, дорогостоящей шаблонной пробирики и позволяет ему больше времени уделять творческим поискам.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Barski G., Lepine P., *Annls Inst., Pasteur, Paris*, **86**, 693 (1954).
2. Melnick J. L., Opton E. M., *Bull. Wld Hlth. Org.*, **14**, 129 (1956).
3. Johnston P. B., Grayston J. T., Loosli C. G., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **94**, 338, (1957).
4. Lennette E. H., Neff B. J., Fox V. L., *Am. J. Hyg.*, **65**, 94 (1957).
5. Rightsel W. A., Schultz P., Muetning D., McLean I. W., *J. Immun.*, **76**, 464 (1956).
6. Takatsy G., *Acta microbiol. hung.*, **3**, 191 (1955).
7. Sever J. L., *J. Immun.*, **88**, 320 (1962).
8. Rosenbaum M. J., Phillips I. A., Sullivan E. J., Edwards E. A., Miller L. F., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **113**, 224 (1963).
9. Sullivan E. J., Rosenbaum M. J., *Am. J. Epidem.*, **85**, 424 (1967).
10. Edwards E. A., Peck R., *Rep. Bur. Med. Surg., U. S. Navy Dept., Washington, D. C.* 1964, No. MR 005.09—1300.1.
11. Eagle H., *Science N. Y.*, **122**, 501 (1955).
12. Earle W. R., *J. natn Cancer Inst.*, **4**, 165 (1943).

13. Morgan J. F., Morton H. J., Parker R. C., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **73**, 1 (1950).
14. Leibovitz A., *Am. J. Hyg.*, **78**, 173 (1963).
15. Schmidt N. J., Lennette E. H., Hanahoe M. F., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **121**, 1268 (1966).
16. Tilles J. G., Finland M., *Appl. Microbiol.*, **16**, 1706 (1968).
17. Youngner J. S., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **85**, 202 (1954).
18. Hayflick L., Moorehead P. S., *Expl Cell Res.*, **25**, 585 (1961).
19. Lamb G. A. K., Glezen W. P., Chin T. D. Y., *Publ. Hlth. Rep. Wash.*, **80**, 463 (1965).
20. Kende M., Robbins M. L., *Appl. Microbiol.*, **13**, 1026 (1965).
21. Schmidt N. J., Lennette E. H., Dennis J., *Immun.*, **100**, 99 (1968).
22. Gwaltney J. M., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **122**, 1137 (1966).
23. Stott E. J., Tyrrell D. A. J., *Arch. Virusforsch.*, **23**, 236 (1968).
24. Schmidt N. J., Lennette E. H., Hanahoe M. F., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **122**, 1062 (1966).
25. Wulff H., Soeken J., Poland J. D., Chin T. D. Y., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **125**, 1045 (1967).
26. Harris D. J., Wulff H., Ray C. G., Poland J. D., Chin T. D. Y., Wenner H. A., *Am. J. Epidem.*, **87**, 419 (1968).
27. Moreau P., Furesz J., *Can. J. Microbiol.*, **13**, 313 (1967).
28. Kriel R. L., Wulff H., Chin T. D. Y., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **130**, 107 (1969).
29. Rosenbaum M. J. Unpublished observations.
30. Schmidt N. J., Lennette E. H., King C. J., *J. Immun.*, **97**, 64 (1966).
31. Rosenbaum M. J., De Berry P., Sullivan E. J., Edwards E. A., Pierce W. E., Muldoon R. L., Jackson G. G., Peckinpaugh R. O., *Am. J. Epidem.*, **88**, 45 (1968).
32. Vogel J., Shelekov A., *Science, N. Y.*, **126**, 358 (1957).
33. Smith C. B., Canchola J., Chanock R. M., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **124**, 4 (1967).
34. Rosenbaum M. J., Earle A. M., Chapman A. L., Sullivan E. J., *Lab. Pract.*, **17**, 713 (1968).
35. Lennox E. S., Kaplan A. S., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **95**, 700 (1957).
36. Rosenbaum M. J., Miller L. F., Sullivan B., Rosenthal S. R., *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.*, **19**, 357 (1960).
37. Beno D. W., Lytle R. I., Edwards E. A., *Bact. Proc. (Am. Soc. Microbiol.)*, p. 120 (1965).
38. Sousa C. P., Evans D. G., *Br. J. exp. Path.* **38**, 644 (1957).
39. Brody J. A., Huntley R., *Nature, Lond.*, **208**, 1232 (1965).

КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ В ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИРУСОЛОГИИ

Д. БЕРТРАН

Department of Clinical Virology, St. Thomas's Hospital, London

На протяжении ряда лет однослойные клеточные культуры используются для различных лабораторных исследований. Первое сообщение [1] о размножении вируса на клеточных культурах появилось в 1949 г. Авторы [1] описывали метод получения и культивирования вируса полиомиелита; этот метод лег в основу последующих попыток выделить вирусы из различных источников. Современная систематика вирусов теперь уже не может обойтись без применения методики однослойных клеточных культур.

Эта глава дает краткое представление об истории использования тканевых культур в вирусологии, а также о возможности с помощью таких культур диагностировать вирусные инфекции человека. В каждом разделе приведены ссылки на соответствующие работы, вышедшие за последние годы, и комментарии автора, основанные на собственном опыте по выделению вирусов у больных.

ИСТОРИЯ ВОПРОСА

После работы Эндерса и др. [1] было изолировано много до тех пор неизвестных вирусов, среди которых вирусы коксеки [2,3], ЕСНО-вирусы [4], аденовирусы [5,6], респираторный синцитиальный вирус [7] и цитомегаловирус [8]. Кроме того, было обнаружено, что многие известные вирусы, например вирус герпеса простого и вирус гриппа, хорошо размножаются в однослойных культурах.

Успехи в технике культивирования, которые позволили наблюдать не только видимые изменения в тканевых культурах, привели к открытию гемадсорбирующих вирусов, относящихся к группе миксовирусов [12]. Наблюдения за явлением интерференции позволили изолировать вирус краснухи [13]. Ко времени написания этой книги число новых вирусов, выделяемых с помощью однослойных культур, резко уменьшилось по сравнению с числом вирусов, открытых сразу же после получения вируса полиомиелита. Оказалось, что некоторые вирусы трудно изолировать в однослойных культурах, и в таких случаях требуются другие более изощренные методы, например применение культур органов [14]. Однако однослойные культуры не утратили своего значения. Если бы не их применение, природа многих тяжелых заболеваний человека и животных осталась бы загадкой, а следовательно, была бы невозможной и профилактика этих заболеваний.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

Задача диагностической вирусологической лаборатории состоит в определении вирусной инфекции у больных с помощью серологических методов или методов выделения вируса. Используя оплодотворенные яйца, лабораторных животных, культуры тканей и серологические тесты, такая лаборатория должна располагать методами, выявляющими все или почти все широко распространенные вирусы. В этой главе описаны методы применения и выращивания тканевых культур.

Культура тканей в диагностической вирусологии применяется для следующих целей: 1) выделения и идентификации вирусов; 2) обнаружения вирусной инфекции по значительному увеличению количества антител в парных сыворотках; 3) приготовления антигенов и антител для использования в серологических тестах. Основными источниками тканей для получения однослойных культур служат ткани животных, например почки обезьян, злокачественные опухоли человека, из которых получены клетки HeLa и др., ткани зародыша человека.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Оборудование лаборатории, в которой используют методы культивирования клеток, сходно с оборудованием многих других биологических лабораторий. Необходимы термостаты, водяные бани и небольшие центрифуги. В лаборатории автора этой главы имеется теплая комната, оборудованная металлическими полками, температурный градиент в которой устанавливается с помощью вентиляторов; местоположение этих вентиляторов тщательно рассчитано. Комната с температурным градиентом очень удобна, поскольку некоторые вирусы успешно размножаются при температуре 33—35 °С, тогда как другие — при 37 °С. Для изоляции некоторых респираторных вирусов необходимо иметь аппарат для вращения культуральных сосудов. Вращение со скоростью 8—10 об/мин благоприятно сказывается на росте культуры независимо от того, инокулированы они или нет.

Все процедуры, связанные с культивированием клеток, необходимо проводить в отдельной чистой и хорошо вентилируемой комнате. В эту комнату никогда нельзя вносить вирусы. Помещение должно иметь ультрафиолетовые лампы, расположенные на расстоянии примерно 15 см от поверхности стола. Эти лампы включают каждый раз после окончания работы для стерилизации рабочего места. Если лампы установлены слишком высоко над столом, то большая часть ультрафиолетового света поглощается, не достигнув стола, и, следовательно, мы не можем быть уверены в эффективной стерилизации. Следует помнить, что ультрафиолетовый свет вызывает ожоги кожи и роговицы глаза.

Для культивирования не требуется какой-то особой стеклянной посуды. Достаточно иметь пробирки и флаконы разных размеров. Вся посуда должна быть чистой и стерильной. Для работы удобны пробирки размером 100×10 мм. Эти пробирки получают чистыми, так что их можно сразу же стерилизовать, не затрачивая время на мытье. Автор пришел к заключению, что удобнее выбрасывать пробирки после однократного пользования, чем мыть их и использовать повторно. Закрывать пробирки лучше всего силиконизированными резиновыми

пробками, которые практически не разрушаются в процессе работы. Однако они дороги, и вместо них можно использовать пробки из белой резины, срок годности которых около 6 мес.

Для хранения запасных культур используют матрасы различных типов. В том случае, когда требуется оптически чистое стекло, используют матрасы Рауса. Эти матрасы стоят дорого, поэтому их не выбрасывают, а моют и используют многократно. Существует несколько методов мытья посуды многократного пользования; некоторые из них довольно сложны. Ниже описан метод, применяемый в лаборатории автора.

Стеклянную посуду вместе с содержимым стерилизуют автоклавированием. Затем сосуды в течение ночи замачивают в разбавленном растворе детергента (Rugoprep). После этого внутреннюю поверхность сосудов энергично промывают ершиком, чтобы удалить оставшиеся клетки. Затем посуду 6 раз споласкивают водопроводной водой и, наконец, дистиллированной. Стеклянные крышки от флаконов, резиновые пробки и прокладки кипятят в растворе детергента, а затем промывают таким же способом, как и посуду. Постоянный контроль за чистотой посуды осуществляют сами культуры. Если клетки растут хорошо, значит посуду моют правильно.

Для культивирования клеток используют и пластиковую посуду, хотя она довольно дорого стоит. Пластиковые чашки Петри имеются в продаже уже несколько лет, но лишь сравнительно недавно их стали выпускать специально для целей культивирования тканей. Некоторая выпускаемая в настоящее время посуда из пластика имеет прекрасные оптические свойства. Для выращивания больших количеств клеток удобны пластиковые детские «рожек», хотя пластик, из которого они сделаны, плохо пропускает свет.

КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА

Ряд фирм выпускает для культивирования тканей готовые среды вполне хорошего качества. Среда рекомендуется покупать в концентрированном виде — это и

удобнее и обходится значительно дешевле. Чаше других используют среду 199 [15] и минимальную среду Игла [16]; покупать их можно в десятикратных концентрациях. Большая часть клеточных линий растет на любой из этих сред при добавлении 5—10% сыворотки и при рН 6,8—7,2. Для создания в среде определенной величины рН используют 4,4%-ный раствор бикарбоната натрия, рН которого доводят до 7,0 двуокисью углерода.

Как добавку к среде обычно используют телячью сыворотку; часто используют эмбриональную сыворотку; ее, в частности, добавляют в поддерживающие среды. Иногда требуются небольшие количества кроличьей сыворотки.

Кроме упомянутых, выпускается ряд других сред, которые не обязательно иметь диагностическим лабораториям. К числу наиболее широко используемых антибиотиков относятся пенициллин и стрептомицин; наряду с антибиотиками применяют также антигрибковые препараты; в последнее время в ряде лабораторий вместо стрептомицина используют гентамицин (в концентрации 50 ед./мл), поскольку он более стабилен и его можно стерилизовать автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин. Антибиотики удобно держать в растворах определенной концентрации. При добавлении одной такой аликвоты к среде конечная концентрация должна составлять 100—200 ед./мл для пенициллина, 100—200 мкг/мл для стрептомицина и до 25 мкг/мл для антигрибковых препаратов. Следует помнить, что культуры тканей могут быть чувствительны к высоким концентрациям антибиотика.

ВЫБОР КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

К несомненным успехам в развитии диагностической вирусологии следует отнести создание небольших лабораторий с немногочисленным штатом при медицинских вузах и крупных больницах. Так как ресурсы и денежные средства таких лабораторий невелики, необходимо выбрать наиболее подходящие для текущей работы клеточные линии. Исходя из собственного опыта, я считаю, что для постоянной работы небольшой диагностической

Таблица 4.1

Относительная чувствительность клеток разных тканей к вирусам

Вирус	PMK	HeLa	Клетки легких эмбриона человека	Клетки амниона человека	Другие ткани
Полиомиелита	+++	++	++	++	—
ECHO	+++	++	++	++	—
Коксеи А	(++)	+	+	+	Мыши-сосунки +++ То же
Коксеи В	+++	+	+++ ¹	+	—
Риновирус, штамм М	+++	+	+++	+	Культуры органов +++
Риновирус, штамм Н	+++	+	+++	+	Оплодотворенные яйца +++
Группы гриппа	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца ++
Группы парагриппа	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца ++
Свинки	+++	+++	+++	+++	—
Кори	+++	+++	+++	+++	—
RSV	+++	+++	+++	+++	—
Аденовирус	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца ++
Простого герпеса	+++	+++	+++	+++	—
Опоясывающего лишая	+++	+++	+++	+++	—
Цитомегаловирус	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца +++
Осповакцины	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца +++
Оспы	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца +++
Краснухи	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца +++
Бешенства	+++	+++	+++	+++	Оплодотворенные яйца +++
LCM	+++	+++	+++	+++	RK13 +++ Мыши-сосунки +++
Арбовирусы	+++	+++	+++	+++	То же »

+++ — высокая чувствительность клеток, ++ — средняя, + — низкая чувствительность клеток, — — вирус не размножается, ECHO — Enteric cytopathic human orphan (энтеровирус человека), RSV — Respiratory syncytial virus (респираторный синцитиальный вирус), LCM — Lymphocytic choriomeningitis virus (лимфоцитарный хориоменингитный вирус), PMK — Primate monkey kidney cells (первичная культура клеток почек обезьяны).
¹ В этой системе растут только 30% риновирусов штамма Н.

лаборатории достаточно иметь всего три типа культур. К ним относятся: 1) первичные или вторичные культуры почки обезьяны; 2) линия эмбриональных фибробластов человека; 3) перевиваемая клеточная линия, например клетки HeLa.

Данные о чувствительности этих клеток к вирусам приведены в табл. 4.1. Идеальная клеточная система пока еще не найдена. Однако выбранные типы клеток должны удовлетворять следующим условиям:

1. Должны быть чувствительны к возможно большому числу вирусов; желательно ко всем типам, известным для человека.
2. Необходимо, чтобы неинфицированные клетки сохраняли в культуре нормальную морфологию не менее 14 дней, а после инфицирования через положенный срок в клетках должны выявиться четкие изменения.
3. Должны сохранять жизнеспособность на простых средах при добавлении имеющейся сыворотки.
4. Должны сохранять жизнеспособность при хранении их в жидком азоте.
5. Культуры должны быть свободными от случайно попавших в них агентов, таких, например, как плесневые грибы и вирусы.

ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ПОЧКИ ОБЕЗЬЯНЫ

Эти клетки получают из свежих почек различных видов обезьян, чаще всего макака (резус), мартышек (патас, зеленой) и циномольтусов.

У обезьян в стерильных условиях удаляют почки, затем отделяют корковое вещество и режут его на небольшие кусочки. Кусочки обрабатывают трипсином, который дезагрегирует эпителиальные клетки. Число клеток в суспензии подсчитывают с помощью гемацитометра и помещают в питательную среду из расчета 300 000 клеток на 1 мл. Для роста клеток рекомендуют использовать среду 199 с добавлением 5% телячьей сыворотки, pH 7,2.

Суспензию инокулируют в пробирки или матрасы, по 1 мл в каждую пробирку и соответствующее количество в матрасы. Монослой образуется через 2—4 дня. Образовавшийся монослой сохраняется на среде 199 без сыворотки при условии, что среду меняют по крайней мере два раза в неделю. Культуры, используемые для выделения миксовирусов, перед инокуляцией отмывают от сыворотки, в которой могут присутствовать вирусные ингибиторы.

Вторичные культуры получают из клеток, растущих в матрасах, засеянных одновременно с пробирками. Клетки снимают со стекла механически или с помощью фермента, подсчитывают и разливают по пробиркам в концентрации 100—300 тыс. клеток на 1 мл. Использование клеток вторичных культур имеет определенные преимущества. Во-первых, из одной почки можно получить много клеток, поэтому нет нужды в большом числе животных. Во-вторых, клетки хорошо растут и не загрязнены обезьяньими вирусами. И наконец, в-третьих, на случай неудачи в процессе работы в термостате можно хранить запасные культуры.

Культуры клеток почки обезьяны можно сравнить в какой-то мере с кровяным агаром в бактериологии. На этих культурах размножается большое число разных вирусов (табл. 4.1). Клетки хорошо растут, быстро образуют монослой и при условии регулярной смены среды сохраняются в хорошем состоянии в течение четырех недель. После хранения в жидком азоте клетки почки обезьяны хорошо возобновляют рост.

В клетках первичной культуры почки обезьяны и в меньшей степени в клетках вторичной культуры накапливаются обезьяньи вирусы, что может мешать при выделении других вирусов. Наиболее часто среди этих контаминантов встречается обезьяний вирус 5, который относится к группе парамиксовирусов. Клетки, зараженные этим вирусом, способны к гемадсорбции. Присутствие вируса 5 в культуре препятствует выделению большинства представителей группы миксовирусов. Добавляя в культуральную среду антисыворотку, специфичную в отношении этого вируса, можно полностью избавиться от него. К другим частым контаминантам относятся

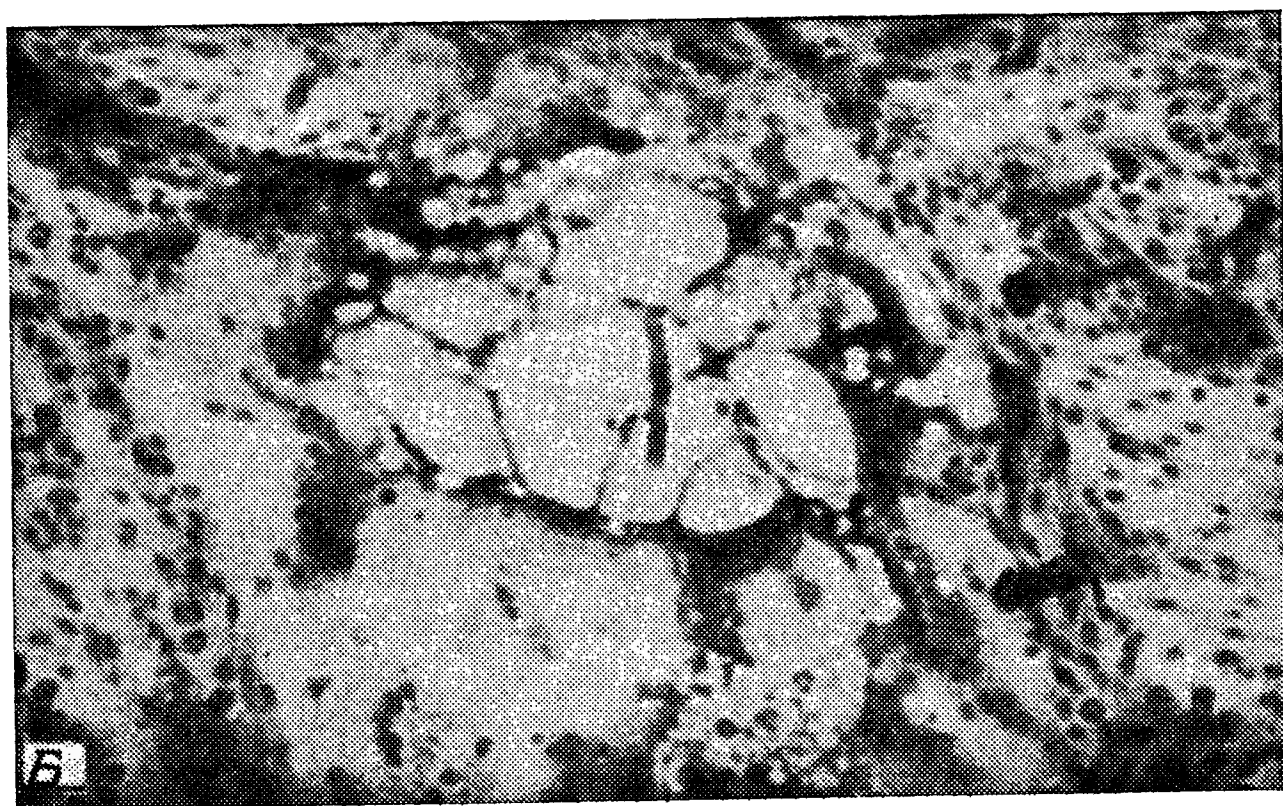
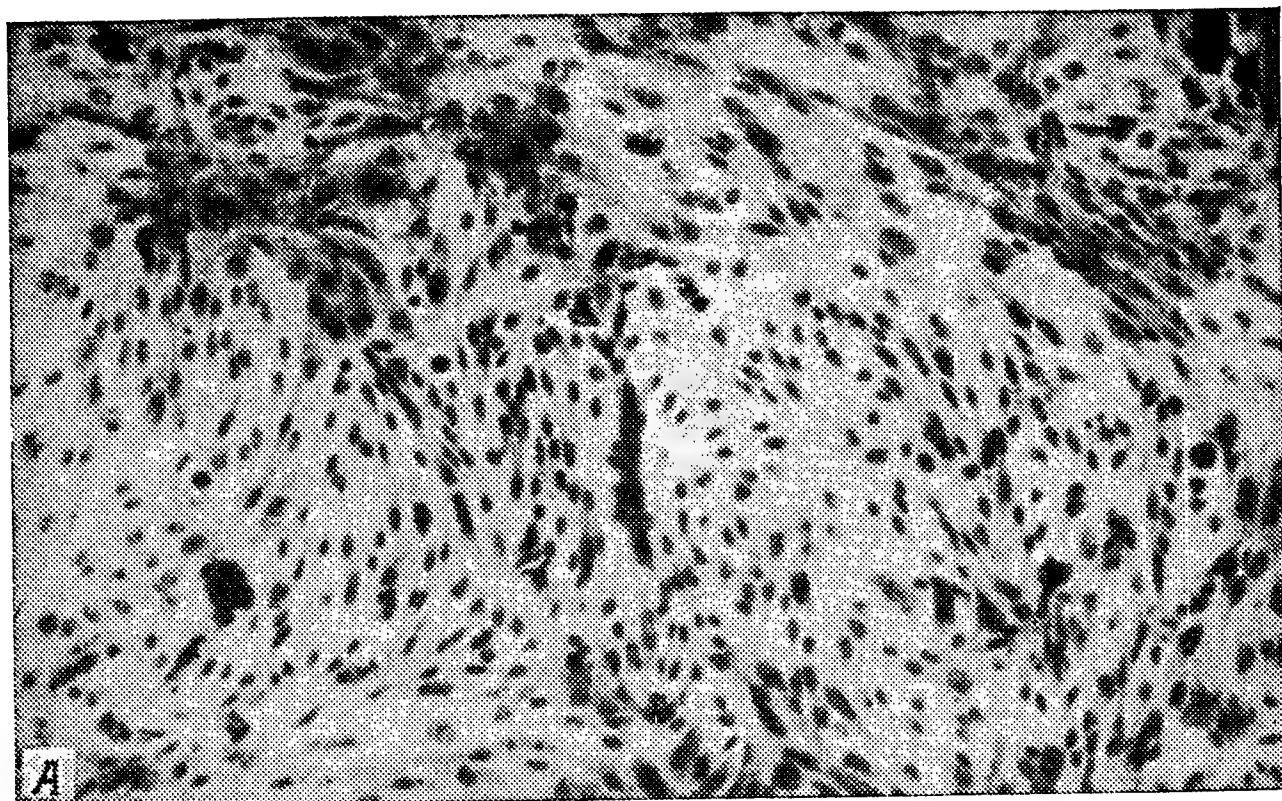


Рис. 4.1.

А. Нормальная культура клеток обезьяньей почки. Б. Пенящий агент в клетках обезьяньей почки.

обезьяний вирус 40, вызывающий спонтанную дегенерацию и являющийся онкогенным, и так называемый пенящий агент, вызывающий образование обширного вакуолизированного синцития (рис. 4.1). Развитие цитопатических эффектов, обусловленных наличием этих вирусов, можно замедлить, ежедневно меняя среду. Од-

нако лучший способ избавиться от контаминантов — это брать в работу только клетки, свободные от вирусов.

В клетках обезьяны найдены некоторые опасные вирусы и среди них наиболее известен обезьяний вирус герпеса (вирус В). Этот вирус вызывает изъязвление ротовой полости у обезьян. У человека он вызывает тяжелый энцефаломиелит. В 1968 г. в Германии был выделен возбудитель другой тяжелой болезни человека — гепатита, — которая в некоторых случаях кончалась летальным исходом. Этот вирус вновь был выделен из клеток обезьян. Считают, что он принадлежит к пока еще неизвестной группе вирусов. Поэтому крайне важно, чтобы любой из работников вирусологической лаборатории немедленно обращался к врачу не только при укусах и царапинах, нанесенных обезьяной, но также и в случае, если он поранил себе руки, работая с клеточными культурами.

HELA И ДРУГИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫЕ ЛИНИИ КЛЕТОК

Культура клеток HeLa была получена из карциномы шейки матки в 1952 г. [18]. Это злокачественные клетки, характеризующиеся различным кариотипом и сходные по своей морфологии с клетками плоского эпителия. В работе используют также клетки линий HEp2 [19] и KB [20]. Клетки этих линий легко культивировать, и они чувствительны ко многим вирусам. В основном их используют для выделения и идентификации аденовирусов, вируса герпеса простого и респираторного синцитиального вируса.

Для вирусологических исследований клетки HeLa обычно культивируют в матрасах, где они образуют монослой. Два раза в неделю клетки пересевают, для чего их снимают со стекла либо 0,02%-ным версеном, либо 0,25%-ным трипсином, суспендируют в ростовой среде и подсчитывают. Полученную клеточную суспензию разбавляют ростовой средой так, чтобы в 1 мл содержалось 100 000 клеток. При такой посевной дозе клетками, содержащимися в одном матрасе объемом 100 см³, можно засеять 60 пробирок. Если опыт предполагается ставить вскоре после посева, то можно засеять пробирки

из расчета 500 000 клеток на 1 мл. Посевная доза при пересевах для поддержания штамма составляет 100 000 клеток на 1 мл.

Ростовая среда для культивирования этих клеток состоит из смеси минимальной среды Игла и 10% телячьей сыворотки, рН 7,0. В качестве поддерживающей среды для сформированного монослоя используют минимальную среду Игла с добавлением 2% телячьей или эмбриональной телячьей сыворотки, рН 7,4.

Клетки, на которых выращивают респираторный синцитиальный вирус, культивируют в особых условиях. Для получения этого вируса обычно используют клетки HeLa штамма Бристоль. Их культивируют на среде с добавлением кроличьей сыворотки. В лаборатории автора респираторный синцитиальный вирус получают на клетках HEp2, которые выращивают на среде с эмбриональной телячьей сывороткой. Выбранную клеточную систему необходимо время от времени проверять на чувствительность к этому вирусу. Клетки HeLa хорошо сохраняют жизнеспособность при хранении в жидком азоте.

Большинство постоянных клеточных линий заражено микоплазмами. Эти организмы обычно размножаются медленно и поэтому не препятствуют росту вируса. Однако при увеличении скорости их размножения в культурах накапливаются продуцируемые ими кислые продукты, которые оказывают токсическое действие на клетки. В такие культуры можно добавлять антибиотики, например тетрациклин. Но лучше всего браковать зараженные культуры и заменять их новыми из запасных культур. Заражение клеток бактериями, грибами и вирусами наблюдается редко, если при работе соблюдаются все меры предосторожности.

ФИБРОБЛАСТЫ

Культуры фибробластов получают из разных источников, в том числе из куриных эмбрионов и эмбрионов человека. Клетки имеют веретеновидную форму и растут, образуя плотно расположенные завитки, так что рисунок монослоя напоминает отпечаток пальца. Морфология монослоя этих клеток очень характерна.

Чаще всего культуры фибробластов получают из легких эмбриона человека (HEL); другой источник их получения — кожно-мышечный лоскут. Наиболее известен штамм фибробластов № 38 Вистарского института (WI-38). Эти клетки чувствительны ко многим вирусам, в том числе энтеровирусам, всем вирусам группы герпеса и к большинству риновирусов. Главный недостаток этих клеток заключается в том, что они плохо растут на многих вариантах среды Игла, а также бывают чувствительны к некоторым партиям телячьей сыворотки. Удобнее получить собственную лабораторную линию этих клеток из свежих легких.

Для получения культуры легочных клеток лучше всего использовать эмбрионы в возрасте 14—18 недель; практически же приходится пользоваться любым имеющимся материалом. Легкие освобождают от фиброзной ткани, оставшуюся мягкую бледноокрашенную ткань нарезают на кусочки размером около 1 мм³. Кусочки отмывают от крови и суспендируют в 0,25%-ном растворе трипсина. Суспензию инкубируют в течение 30 мин при 37°C, после чего надосадочную жидкость удаляют. Оставшуюся ткань трижды обрабатывают трипсином по 30 мин каждый раз и собирают надосадочную жидкость после каждой обработки. Суспендированные клетки отделяют от трипсина центрифугированием при низких скоростях. Осадок клеток ресуспендируют в ростовой среде, объем которой примерно в 70 раз превышает объем клеток, и разливают в культуральные сосуды.

Характерный монослой образуется через 48—72 ч после посева. Первые три дня среду нужно менять через каждые 24 ч для удаления разрушенных клеток. После образования монослоя клетки можно снять со стекла 0,25%-ным трипсином и пересеять в новые сосуды, так же как это было описано для клеток HeLa. В качестве ростовой и поддерживающей сред используются такие же среды, как и для клеток HeLa.

Получив новую линию, необходимо испытать ее в отношении вирусов, которые предполагается на ней выращивать, причем в тех же условиях. Параллельно с новой линией используют линию клеток, чувствительность которой известна. Если количество вируса и скорость

его роста одинаковы для обеих линий, то новые клетки пригодны для работы.

Линии фибробластов часто бывают полупостоянными, т. е. их можно пересевать, но ограниченное число раз. Число пересевов колеблется от 30 до 50. Чтобы сохранить линию в лаборатории, необходимо законсервировать как можно больше клеток первых пересевов. Эти клетки обычно хорошо сохраняют жизнеспособность при хранении.

Фибробласты пересевает так же, как и клетки HeLa. Подсчитывают число клеток в суспензии и засевают в пробирки или матрасы из расчета 300 000 клеток на 1 мл. При такой дозе посева клетками из одного матраса объемом 100 мл³ можно засеять около 30 пробирок. Сплошной монослой получают через 3—4 дня. Культуры, в которых поддерживающую среду меняют по крайней мере два раза в неделю, хорошо сохраняются до 8 нед.

Фибробласты используют главным образом для выделения и идентификации вирусов группы герпеса, особенно таких «капризных» представителей этой группы, как вирусов ветряной оспы и опоясывающего лишая и цитомегаловируса. Цитомегаловирус человека можно выделить только с помощью фибробластов человеческого происхождения. Изучение этого вируса приобретает все большее значение, поскольку с ним связаны внутриутробная инфекция, посттрансфузионный синдром и болезни типа инфекционного мононуклеоза. По этой причине в диагностической лаборатории нужно иметь линию фибробластов. С помощью фибробластов легко выделить кишечные вирусы, в частности вирусы группы ЕСНО. На некоторых линиях хорошо размножаются риновирусы штамма Н.

В культурах фибробластов встречаются латентные вирусы. Исследователи, которые работают с такими культурами, должны проверять свои линии на присутствие в них вируса краснухи. Заражение краснухой на ранних сроках беременности приводит в 30% случаев к внутриутробной инфекции плода, что нередко вызывает тяжелые врожденные уродства. Присутствие вируса краснухи на ранних сроках беременности является

достаточным основанием для ее прерывания. Ткани таких эмбрионов могут быть сильно инфицированы вирусом краснухи.

КУЛЬТУРА АМНИОНА ЧЕЛОВЕКА

Эти клетки получают из плаценты, взятой при кесаревом сечении. Амнион отделяют от плаценты и отмывают от крови. Промытую ткань разрезают на небольшие кусочки и обрабатывают 0,25%-ным раствором трипсина. Полученную суспензию отмывают от трипсина, подсчитывают число клеток и засевают в пробирки из расчета по 500 000 клеток на 1 мл. Монослой эпителиальных клеток образуется через 4—7 дней. Эти клетки пригодны для выделения энтеровирусов, особенно вируса полиомиелита и ветряной оспы. Однако и здесь имеются свои недостатки. Во-первых, неприятна сама процедура получения клеток, так как приходится иметь дело с довольно грязным материалом. Во-вторых, нельзя точно знать сроки получения плаценты. И наконец, в-третьих, не всегда получаются успешные культуры.

Отметим также, что до сих пор неизвестны вирусы, которые размножались бы только в культуре амниотических клеток и не размножались бы в культурах описанных выше тканей, значительно более удобных для работы.

РАБОТА С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ

Для диагностической вирусологической лаборатории постоянно требуются клеточные культуры в хорошем состоянии, причем обычно опыт на культурах продолжается не менее 14 дней. Как правило, культуры готовят к работе раз в неделю. Быстро размножающиеся клетки, такие, например, как клетки HeLa, пересевает дважды в неделю. Как показывает опыт, запас культур в пробирках для недельной работы должен превышать истинную потребность. Кроме того, для бесперебойной работы лаборатории необходимо следить, чтобы всегда в достаточном количестве имелись запасные культуры.

Еженедельно необходимо возобновлять по 1 партии

клеток почки обезьяны и фибробластов и по 2 партии клеток НЕр2. Большое количество клеток почки обезьян инокулируется по двум причинам. Во-первых, процесс выделения энтеровируса требует большого числа пробирок для идентификации его с помощью нейтрализации. Во-вторых, если культура вдруг случайно прольется, то не всегда бывает удобно тотчас же удалять почку у обезьяны и, следовательно, невозможно получить запас вторичных клеток. Брать для этой цели клетки из основного запаса довольно расточительно. Поэтому считается более экономичным выбрасывать 100 неиспользованных пробирок каждую неделю, чем иметь недостаток культур в случае крайней необходимости. При нехватке клеток некоторые образцы замораживают, пока не появится возможность получить новые культуры. Следует отметить, что при замораживании некоторая часть вирусов, находящихся в образце, может инактивироваться.

При работе с клеточными культурами нужно строго соблюдать все меры предосторожности, чтобы избежать попадания инфекции. Если нет специальной комнаты для работы с культурами, то сначала лучше провести все операции с клетками, а потом уже приступить к работе с вирусами. Стол должен быть чистым и свободным от оборудования, которое не требуется для манипуляций с клеточными культурами. Горлышки пробирок, флаконов и матрасов нужно обжечь пламенем перед тем, как открыть и закрыть их. Пробки следует брать пинцетом. Эти элементарные меры предосторожности часто не соблюдают, если в культуральной среде содержатся антибиотики и антигрибковые препараты. Следует помнить, что антибиотики подавляют бактериальный рост, но они не абсолютно надежны, а если в культуры попала инфекция, то избавиться от нее чрезвычайно трудно.

ХРАНЕНИЕ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

Заражение клеточных культур происходит порой даже при очень хорошо организованной работе с ними. Восполнить погибшие по тем или иным причинам куль-

туры можно за счет запаса клеток, хранящихся в жидком азоте. На рис. 4.2 показан аппарат для хранения большого числа ампул, которые погружают в жидкий азот. В более поздних моделях контейнеры с клетками хранятся в газовой фазе, а не погружены в жидкость. Это усовершенствование позволяет хранить клетки в маленьких бутылочках (7 см³) с завинчивающимися пробками.

Методика хранения клеток в замороженном виде в основном одинакова для всех клеточных линий. Для этой цели отбираются молодые культуры, находящиеся в хорошем состоянии. Клетки снимают со стекла обычным методом и концентрируют до 1 000 000 клеток в 1 мл; желательно получать даже более концентрированные суспензии. Среда, в которой хранятся клетки, состоит из обычной ростовой среды и консерванта, например 10—15%-ного забуференного глицерина или диметилсульфоксида. Суспензию клеток помещают в стеклянные ампулы, которые тщательно запаивают. Следует обращать особое внимание, чтобы не переполнять ампулы. Содержимое замораживают, каждую минуту снижая температуру на 1°C. Замораживание продолжают до тех пор, пока температура не упадет от +4 до —50°C или ниже. Более быстрое и более медленное охлаждение вызывает образование кристаллов льда, в результате чего клетки утрачивают жизнеспособность. Сейчас выпускаются специальные аппараты, в которых осуществляется контроль процесса замораживания. За-

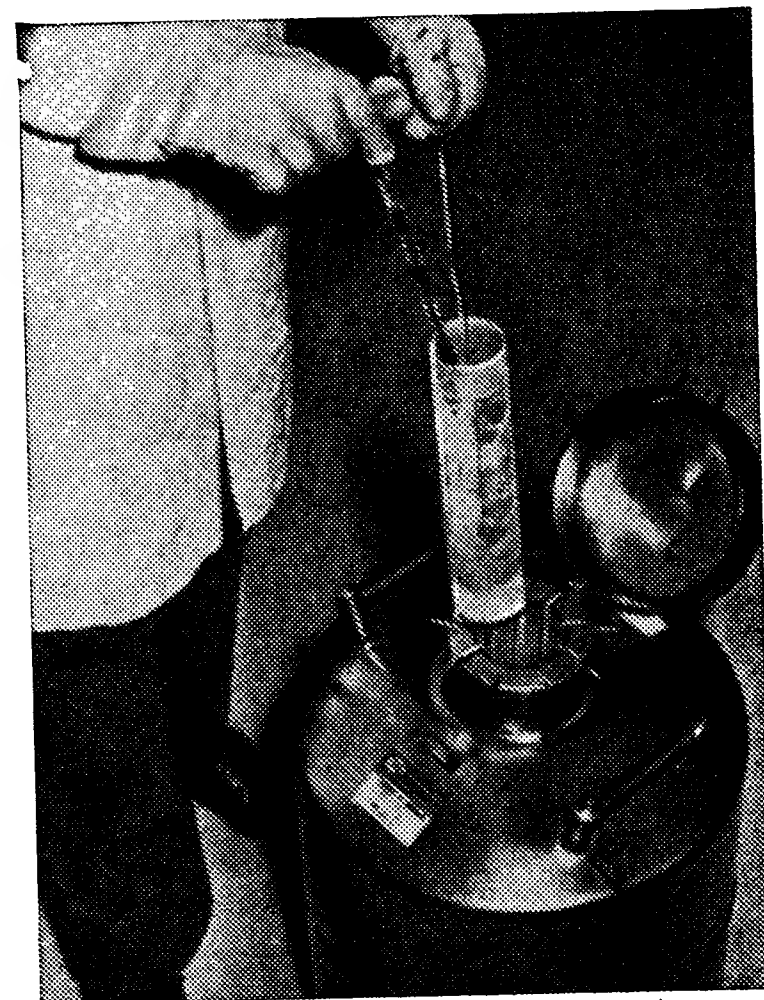


Рис. 4.2. Контейнер с жидким азотом.

Показаны канистра и штатив, в котором хранятся ампулы.

мороженные ампулы помещают в обоймы и опускают ниже поверхности азота.

Для того чтобы клетки возобновили рост, ампулы с клетками переносят из жидкого азота в водяную баню при 37°C. Когда жидкость растает, суспензию клеток отсасывают из ампулы, промывают свежей ростовой средой, чтобы удалить консервант, и помещают во флаконы или пробирки для культивирования.

Работа с жидким азотом требует защитной одежды, особенно защитных очков для глаз. В ампулы, плохо запаянные или с трещинами, попадает азот. Когда такие поврежденные ампулы вынимают из хранилища, жидкий азот в них быстро испаряется, в результате чего ампула может взорваться. При попадании жидкого азота на кожу иногда возникают тяжелые долго не заживающие «ожоги». Намного безопаснее хранить клетки не в стеклянных, а в пластиковых ампулах с завинчивающимися пробками.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Чрезвычайно важно, чтобы пробы для выделения вируса были взяты правильно и как можно быстрее доставлены в лабораторию. Если пробы собраны плохо, то выделение вируса затрудняется.

СРЕДА ДЛЯ ПЕРЕНОСА ВИРУСНОГО МАТЕРИАЛА

Мазки собирают в среду, состоящую из сбалансированного солевого раствора, антибиотиков, необходимых для предотвращения роста бактерий и плесневых грибов, и небольшого количества (0,5%) белка, например бычьего альбумина, добавляемого для стабилизации имеющихся вирусов. Кончик тампона, которым брали мазок, отламывают и помещают в бутылочку с 2—3 мл такой среды. Содержимым бутылочек заражают клеточные культуры, стараясь при этом, насколько возможно, сократить время между взятием пробы и заражением культур. В эту среду можно собирать также кусочки тканей для вирусологического исследования.

Мочу для выделения цитомегаловирусов собирают в среду, содержащую не менее 50% сорбитола. Мочу для выделения других вирусов можно транспортировать, не добавляя среду. Пробы фекалий собирают в картонные вощенные коробочки без какой-либо среды. Перед инокуляцией рН в пробах мочи и суспензии фекалий доводят до 7,0.

Пробы следует доставлять в лабораторию как можно быстрее. Если для доставки пробы требуется не более 48 ч, то после сбора их лучше хранить при 4°C и доставлять упакованными в тающий лед. Если срок доставки превышает 48 ч, то пробы нужно быстро заморозить в смеси сухого льда и спирта и транспортировать в контейнере с сухим льдом.

После того как пробы доставят в лабораторию, необходимо решить, какие культуры инокулировать. Каждая проба должна сопровождаться четким и сжатым описанием клинической картины, с тем чтобы у сотрудников лаборатории сложились некоторые представления о природе инфекции.

В выбранные культуры добавляют по 0,2 мл пробы. Опыт ставится по крайней мере на двух типах культур, причем используют не менее двух пробирок для каждого типа. Контролем служат незараженные культуры. Использовать для инокуляции только один тип клеток неразумно, поскольку нет никакой гарантии в том, что поведение некоего специфического вируса будет соответствовать ожидаемому. Нет также и гарантии в том, что будет выделен вирус, указанный клиническим диагнозом. Кроме того, инокуляция нескольких типов клеточных культур помогает при дифференцировке вирусов.

Инокулированные культуры исследуют микроскопически ежедневно в течение 14 дней. Отмечают изменения, наблюдающиеся в культурах, и, насколько возможно, определяют причину этих изменений.

Многие широко распространенные вирусы вызывают цитопатические эффекты, которые уже хорошо описаны. Яркий пример такого эффекта показан на фиг. 4.3. Некоторые вирусы, однако, такой эффект вызывают гораздо позже, чем, например, феномен гемадсорбции или

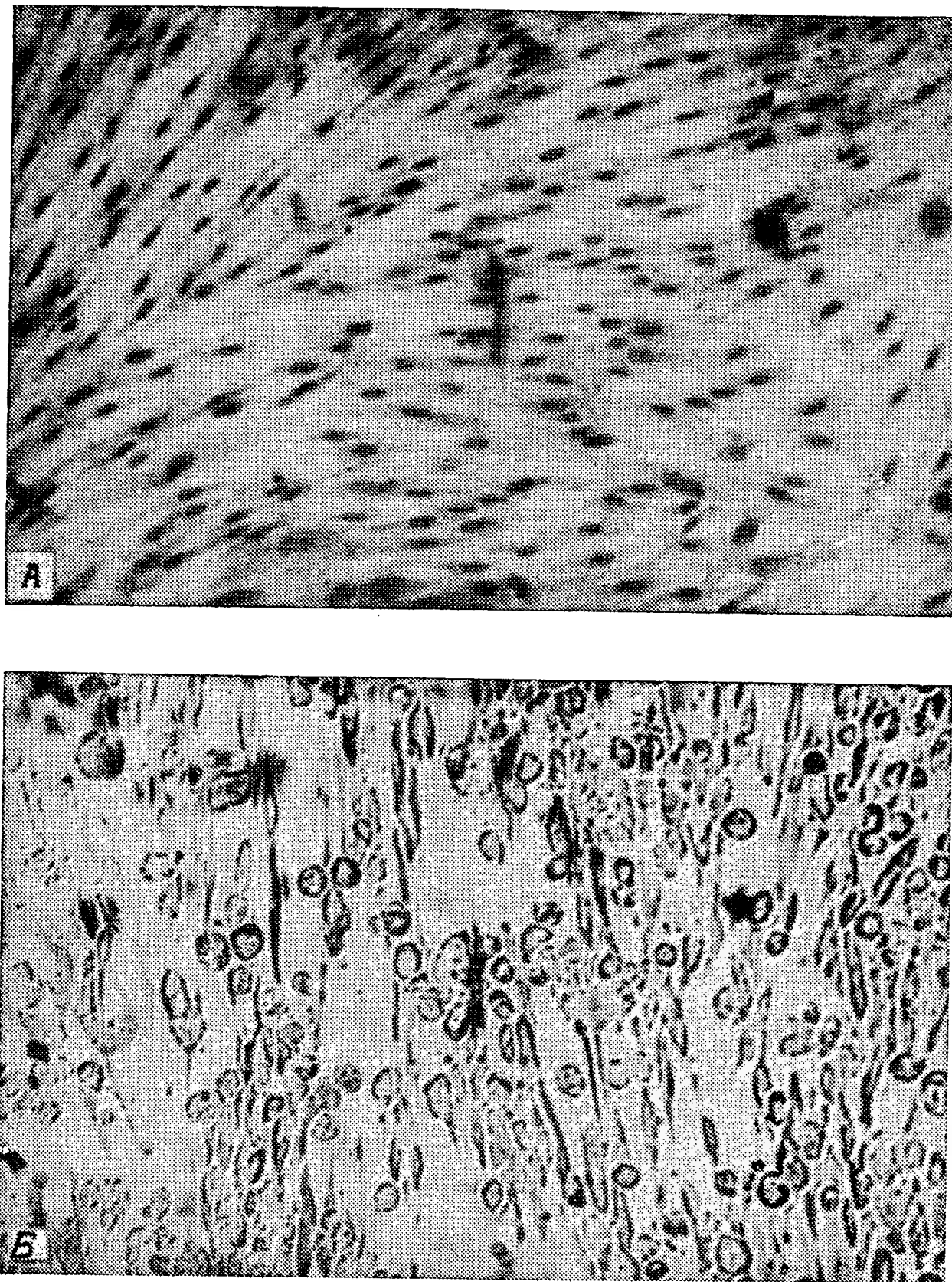


Рис. 4.3.

А. Нормальная культура клеток из легких эмбриона человека. Б. Вирус герпеса простого в клетках из легких эмбриона человека.

интерференции. И наконец, есть вирусы, вовсе не вызывающие цитопатического эффекта, и их можно обнаружить только косвенными методами. Попытки изолировать эти вирусы требуют использования большего числа культур, чем обычно, так как через определенные промежутки времени часть культур изымается для анализа.

Представители группы миксовирусов, за исключением RSV, вызывают гемадсорбцию. Реакцию гемадсорбции ставят следующим образом. Инокулированные культуры и неинокулированные контрольные культуры промывают холодным солевым раствором и в каждую пробирку добавляют 0,5—1,0% (по объему) суспензии эритроцитов морской свинки. После 30 мин инкубации на холоду культуры еще раз промывают холодным солевым раствором, чтобы удалить свободные эритроциты, и исследуют на присутствие эритроцитов, прикрепленных к клеточному пласту. Когда выделяют миксовирусы, необходимо инокулировать достаточно большое количество культур, потому что в течение 21 дня каждые 3 дня берут по одной пробирке для анализа и, кроме того, оставляют некоторый запас культур для идентификации вируса, если он будет обнаружен.

Техника интерференции предложена одной из групп исследователей, которые впервые выделили вирус краснухи [13]. Культуры тканей инокулируют материалом, предположительно содержащим вирус краснухи. После определенного периода инкубации, составляющего обычно 10 дней, часть культур заражают другим вирусом, вызывающим быстрый цитопатический эффект. Интерференция обнаруживается по отсутствию цитопатического эффекта, в то время как в контрольных культурах наблюдается дегенерация клеток. Для обнаружения вируса краснухи используют вирусы ЕСНО, коксеки А9 и Синдбис. «Опознавательные» вирусы не обязательно должны быть родственны интерферирующему вирусу. Интерферирующие агенты можно определить с помощью модифицированной реакции нейтрализации.

Метод иммунофлуоресценции позволяет быстро обнаружить и определить вирусы в культурах тканей. Этот метод, очень важный для диагностики вирусной инфекции, не сложен и требует относительно простого оборудования. С помощью иммунофлуоресценции вирусы идентифицируются значительно быстрее, чем с помощью обычных вирусологических методов. Эта методика подробно обсуждается в гл. 8.

Культуры тканей в сочетании с электронной микроскопией можно использовать для дифференцировки ви-

русов, выделенных из клинического материала. Так, вирусы группы герпеса можно отличить от вирусов оспы по их морфологическим различиям. В будущем для определения вирусов, возможно, будут разработаны методы, сочетающие серологический тест с электронной микроскопией, хотя титрование вируса на ультраструктурном уровне имеет свои недостатки, обусловленные не только высокой стоимостью электронного микроскопа.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУРАХ

В тех случаях, когда в распоряжении исследователя имеются только пробы сыворотки здоровых и больных, для определения содержания антител в сыворотке используют культуры тканей. Антитела ко многим энтеровирусам, в том числе и к вирусам группы полиомиелита, нельзя обнаружить никаким другим методом. Метод нейтрализации и его многочисленные модификации основаны главным образом на смешивании сывороток различных разведений со стандартным количеством живого вируса. После соответствующего периода инкубации образцами полученных смесей заражают культуры тканей. Инфицированные культуры инкубируют снова и ежедневно исследуют для выявления цитопатического эффекта. Этот метод легко приспособить для исследования вирусов, обнаруженных косвенным путем. О присутствии антител судят по торможению цитопатического эффекта, обычно вызываемого этим вирусом. К числу модификаций этого теста следует отнести реакцию торможения гемадсорбции, метод бляшек и метод подавления обмена.

ОБРАЗОВАНИЕ АНТИГЕНА

Многие считают, что дешевле и удобнее получать вирусные антигены самим. Реагенты для использования в реакции связывания комплемента, реакции торможения гемагглютинации и нейтрализации можно получить, используя обычные культуры. В реакции нейтрализации антигеном служит живой вирус с высоким титром —

100 и 10 000 $\times$ — используемого разведения, хотя в некоторых случаях легче посоветовать, чем добиться этого. Чем больше число инфекционных частиц на единицу объема антигена, тем лучше будут результаты. Антиген с высоким титром можно использовать дольше, чем антиген с низким титром, и получаемые при этом данные более однородны. Живые антигены лучше хранить при -70°C в аликвотах, каждая из которых используется один раз, а затем выбрасывается.

Вирусные антигены для реакции связывания комплемента получают путем заражения культур тканей соответствующими вирусами, например вирусом герпеса или полиомиелита, респираторным синцитиальным вирусом или группой аденовирусов. Антигены группы миксовирусов лучше получать, используя для этого оплодотворенные яйца. Комплемент-связывающий антиген вируса краснухи был впервые получен в 1964 г. Севером и др. [21]. Подобные антигены можно приготовить при инокуляции культуры клеток ВНК 21 быстро размножающимся вирусом. На 5—6-й день после посева клетки собирают и обрабатывают глициновым буфером не менее 6 ч при pH 9. Линия ВНК 21 представляет собой быстро размножающиеся фибробласты. Очень быстро эти клетки можно получить в большом количестве и хранить в замороженном состоянии, пока они не потребуются. Многие антигены, связывающие комплемент, которые получают путем заражения культур клеток, лучше хранить в лиофилизированном состоянии.

Антигены для реакции торможения гемагглютинации редко получают с использованием культур тканей, поскольку в других системах титр образующихся гемагглютининов более высок. Можно приготовить антигены миксовирусов, аденовирусов, вирусов оспы и некоторых представителей энтеровирусов. Однако гемагглютининовые титры, специфичные в отношении этих антигенов, могут оказаться недостаточно высокими для использования культуры клеток в практических целях. Вполне удовлетворительный титр можно получить для некоторых представителей группы ЕСНО.

Применение теста на гемагглютинацию вируса краснухи [22] значительно упростило лабораторную диаг-

ностику. Первоначально для выявления вируса краснухи применяли реакцию нейтрализации с использованием в качестве индикатора торможение интерференции в культуре клеток обезьяньей почки. Позднее стали применять метод торможения цитопатического эффекта на перевиваемой линии клеток кроличьей почки (RK-13) [23]. Оба эти метода трудоемки. Обнаружение комплемент-связывающего антигена и гемагглютиниана значительно упростило определение антител к вирусу краснухи. Титр антител, выявляемых в реакции торможения гемагглютинации, резко возрастает в течение недели после появления сыпи. Таким образом, период времени, необходимый для установления диагноза краснухи, сократился с 14 до 7 дней после появления сыпи.

Соответствующий антиген получают в культуре клеток ВНК 21. Культуры инокулируют вирусом с высоким титром и клетки инкубируют пять дней. На 3-й и 4-й день среду меняют, а старую среду соединяют со средой, которую сливают с клеток на 5-й день. Такую среду обрабатывают эфиром и твином 80 и определяют ее активность. Клетки можно использовать для получения комплемент-связывающего антигена методом глициновой экстракции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе автор в общих чертах наметил границы применения метода культуры тканей в диагностической вирусологии. Разумеется, в одну главу невозможно вместить огромное количество накопленных по этому вопросу знаний. Читатель, специально интересующийся этой областью исследования, может воспользоваться основными руководствами, список которых приведен в конце главы.

Сейчас основные усилия вирусологов направлены на поиски эффективных противовирусных препаратов. Несколько таких препаратов уже появилось, однако применение их пока ограничено. Значение диагностических вирусологических лабораторий возрастает по мере создания новых антивирусных препаратов. Кроме того, необходимы поиски новых методов выделения и идентификации вирусов. В настоящее время наиболее перс-

пективными представляются иммунофлуоресценция и электронная микроскопия. До тех пор пока не будут найдены другие методы выделения и идентификации вирусов, тканевые культуры останутся основой всех работ в этой области.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Enders J. F. et al., Science, N. Y., 109, 85 (1949).
2. Dalldorf G., Science, N. Y., 110, 594 (1949).
3. Melnick J. L., Shaw E. W., Curnen E. C., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 71, 344 (1949).
4. Robbins F. C., Enders J. F., Weller T. H., Florentino G. L., Am. J. Hyg., 54, 286 (1951).
5. Rowe W. P., Huebner R. J., Gilmore L. K., Parrot R. H., Ward T. G., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 84, 570 (1953).
6. Hilleman M. R., Werner J. H., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 85, 183 (1954).
7. Chanock R. M., Roizman B., Myers R., Am. J. Hyg., 66, 281 (1957).
8. Smith M. G., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 92, 424 (1956).
9. Bickerstaff E. R., J. Path. Bact. 66, 391 (1953).
10. Mogabgab W. J., Green I. J., Dierkhising O. C., Phillips I. A., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 89, 654 (1955).
11. Mogabgab W. J., Simpson G. I., Green I. J., J. Immun., 76, 314 (1956).
12. Shelekov A., Vogel J. E., Chi L., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 97, 802 (1958).
13. Parkman P. D., Buescher E. L., Artenstein M. S., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 111, 225 (1962).
14. Hoorn B., Tyrrell D. A. J., Arch. Virusforsch., 18, 210, (1966).
15. Morgan J. F., Morton H. J., Parker R. C., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 73, 1 (1950).
16. Eagle H., Science, N. Y., 130, 432 (1959).
17. Smith C. E. G., Simpson D. I. H., Bowen E. T. W., Zlotnik I., Lancet, ii, 1119 (1967).
18. Gey G. O., Coffman W. O., Kubicek M. T., Cancer Res., 12, 264 (1952).
19. Fjelde A., Cancer, N. Y., 8, 845 (1955).
20. Eagle H., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 89, 362 (1955).
21. Sever J. L. et al., Science, N. Y., 148, 385 (1965).
22. Stewart G. L., Parkman P. D., Hopps H. E., Douglas R. O., Hamilton J. P., Meyer H. M., New Engl. J. Med., 276, 554 (1967).
23. McCarthy K. et al., Lancet, ii, 593 (1963).

Основные руководства

Horsfall F. L., Tamm I. (Eds.), Viral and Rickettsial Infections of Man, 4th edn, Pitman Medical, London, 1966.
 Andrewes C. E., Periera H. G., Viruses of Vertebrates. 2nd edn. Ballière Tindall and Cassell, London, 1967.
 Hoskins J. M., Virological Procedures, Butterworths, London, 1967.
 Paul J., Cell and Tissue Culture, 4th edn. Livingstone, Edinburgh, 1970.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Дж. УОСЛИ и Р. ДЖОН

St. Thomas's Hospital Medical School, London

ВВЕДЕНИЕ

В этой главе очень подробно описано несколько испытанных методов культивирования макрофагов млекопитающих, так что она может послужить методической основой для тех, кто захочет заняться исследованием этих клеток в культуре. Важно уяснить с самого начала, что в данном случае культивирование означает лишь поддержание жизнеспособности, поскольку известно, что нормальные дифференцированные макрофаги млекопитающих, как правило, *in vitro* не размножаются.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ

Прежде чем перейти к описанию методик, связанных с культивированием макрофагов млекопитающих, дадим краткую характеристику этих весьма своеобразных клеток, широко распространенных в животных тканях. Макрофаги обладают способностью к амебоидному движению; правда, эта их функция проявляется не всегда. Они способны заглатывать и переваривать с помощью внутриклеточных ферментов различные частицы и растворенные вещества — как эндогенные, так и чужеродные. Будучи производными мезенхимы, макрофаги относятся к лимфоидному ряду, и благодаря своей способности фагоцитировать частицы, которые иногда бывают антигенными, они наряду с лимфоцитами и плазматическими клетками играют важную роль в образовании антител.

Термин «макрофаг» был введен И. Мечниковым [1], который первым оценил значение фагоцитоза для защи-

ты многоклеточных животных от патогенных микроорганизмов. Он предложил данный термин, чтобы отличать эти клетки высших животных от способных к амебоидному движению фагоцитирующих полиморфноядерных лейкоцитов крови, которые он назвал микрофагами.

Клетки, напоминающие макрофаги высших животных, встречаются у разных представителей животного царства, даже у самых примитивных многоклеточных. У низших организмов, у которых нет циркуляторной системы или у которых в циркулирующей жидкости отсутствуют клетки типа микрофагов, макрофаги находятся в соединительной ткани. Они свободно «блуждают» по межклеточным пространствам, соприкасаясь с поврежденными компонентами собственных тканей, а также с чужеродными частицами, включая паразитирующие микроорганизмы. Осуществляя свою функцию, макрофаги достигают соответствующих объектов благодаря хемотаксису и очень часто, особенно при микробном заражении, проявляют способность к быстрому размножению.

Способные к амебоидному движению фагоциты закрепились в процессе эволюции и сохранили большинство своих древних функций. Однако в результате прогрессивного развития различных органов многие макрофаги оказались «встроенными» в структуру органов и (за исключением особых случаев) осуществляют свою функцию там, где они оказались; это так называемые фиксированные макрофаги кровеносных и лимфатических синусоидов.

МАКРОФАГИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

У высших животных и у человека, так же как и у низших животных, макрофаги присутствуют в рыхлой соединительной ткани. Они рассеяны по этой ткани в значительном числе без какой-либо определенной закономерности. Их особенно много в адвентиции кровеносных сосудов, где находятся также различные клетки, являющиеся их предшественниками; они встречаются в субсерозной ткани — под брюшиной и плеврой.

В нормальных условиях макрофаги соединительной ткани не активны и известны как «блуждающие клетки в покое» или адвентициальные клетки. Форма таких покоящихся клеток зависит главным образом от давления со стороны окружающей ткани. В более плотных тканях они плоские, их цитоплазма образует несколько коротких и тупых, а иногда тонких, длинных и ветвистых отростков; в более рыхлой ткани они округлые с меньшим числом цитоплазматических отростков. При стимуляции, например на некоторых стадиях воспалительного процесса, макрофаги соответствующего участка втягивают цитоплазматические отростки, приобретают амебоидную подвижность, становятся активно фагоцитирующими и могут увеличиваться количественно, по крайней мере частично, за счет размножения и дифференцировки соседних клеток-предшественников. В таком активном состоянии (в этот период их обычно относят к гистиоцитам [2]) их иногда накапливается очень много, и они тесно прилегают друг к другу, напоминая эпителий; в этом случае их называют эпителиоидными клетками. При определенных воспалительных реакциях, например при туберкулезе или при попадании в ткань крупных чужеродных частиц, несколько макрофагов могут сливаться друг с другом с образованием многоядерных или гигантских клеток. Ранье [3] заметил, что от активных макрофагов иногда отшнуровываются фрагменты цитоплазмы, и поэтому он назвал их клазмаатоцитами — термин, который сейчас почти не используется. Этот процесс, названный клазмацитозом, можно наблюдать в камере на ухе кролика, а также в культуре макрофагов, однако значение клазмацитоза до сих пор остается не ясным.

У высших животных рыхлая соединительная ткань — не единственный источник подвижных макрофагов. Часть макрофагов возникает из клеток-предшественников в костном мозге, селезенке и, возможно, в лимфатических узлах и попадает в кровяное русло, где они известны как моноциты, или большие одноядерные лейкоциты, на долю которых у человека приходится около 5% всех белых клеток крови. При многих воспалительных реакциях эти циркулирующие макрофаги мигрируют

через стенки мелких сосудов в область воспаления и попадают в соединительную ткань. За этот счет увеличивается общее число макрофагов в ткани. Они активируют «местные» макрофаги, от которых не отличаются ни морфологически, ни функционально.

Макрофаги широко распространены в тканях центральной нервной системы, куда они попадают в процессе эмбриогенеза [4] и где, находясь в состоянии покоя, входят в состав микроглии. Макрофаги и их предшественники присутствуют также в соединительной ткани легких. Отсюда они постоянно мигрируют в альвеолы и выполняют там важную функцию удаления вдыхаемых с воздухом мелких частиц, в том числе и бактерий. Эти клетки фагоцитируют также различные эндогенные вещества, которые попадают в альвеолы в условиях патологии, например эритроциты при застойных явлениях в малом кругу в связи с сердечной недостаточностью. Эти клетки, известные как альвеолярные фагоциты, называются также пылевыми клетками и клетками сердечных пороков. Подобным же образом осуществляется защита других поверхностей организма, которые подвержены загрязнению, например слизистой глотки и кишечного тракта; эту функцию выполняют макрофаги рыхлой субэпителиальной соединительной ткани.

МАКРОФАГИ КРОВЕНОСНЫХ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ СИНУСОИДОВ

Для макрофагов, функционирующих в рассмотренных выше тканях, характерно амебоидное движение: клетки мигрируют туда, где возникает необходимость в их фагоцитарной активности. Иначе функционируют фиксированные макрофаги: различные вещества приносятся к ним с током крови или лимфы. Как уже бегло упоминалось, эти клетки служат структурными компонентами специализированных лимфатических и кровеносных сосудов — синусоидов. Кровеносные синусоиды — это сосуды, которые выстланы не эндотелием, а фиксированными макрофагами. Они образуют густую сеть, которая непосредственно контактирует с клетками в определенных органах: в кроветворной ткани костного

мозга, в красной пульпе селезенки, паренхиме печени (макрофаги здесь называют купферовскими клетками в честь описавшего их автора [5]), в коре и мозговом веществе надпочечников, в передней доле гипофиза, парашитовидной железе и копчиковом тельце. Эти специализированные сосуды соответствуют кровеносным капиллярам других тканей тела. Лимфатические синусоиды представляют собой пути, по которым проходит большая часть лимфы, направляющаяся в лимфатические узлы. Они несколько больше, чем щели в ткани лимфатических узлов, где имеется крупноячеистая ретикулярная сеть, к волокнам которой прикрепляются макрофаги.

СИСТЕМА МАКРОФАГОВ И ЕЕ ФУНКЦИЯ

На основе применения главным образом прижизненных красителей принято считать, что все макрофаги, мигрирующие и фиксированные, сходны. Исследования, которые привели к этому заключению, обобщены в обзоре Ашофа [6] в 1924 г. С тех пор много было сделано для понимания взаимоотношений макрофагов с другими клетками кроветворных и лимфоидных тканей. Интерес к микроморфологии уступил место изучению функциональных особенностей макрофагов. В настоящее время интенсивно исследуется роль этой системы в инфекционном процессе, в образовании антител, метаболизме пигментов крови, в нарушениях липидного обмена, в метаболизме химиотерапевтических препаратов, биохимические и биофизические свойства, а также гиперпластические и неопластические потенции этих клеток. Большая часть этих исследований обобщена в обзорах Капелла [7, 8], Дауни [9], Жакоби [10] и в монографии Нельсона [11].

МАКРОФАГИ В КУЛЬТУРЕ

Метод искусственного культивирования играет важную роль в исследованиях активности и функции макрофагов. Первоначально кусочки эксплантатов, содержащие макрофаги, культивировали на естественных средах главным образом в плазме. При таком способе культи-

вирования плазма быстро свертывается, и клетки оказываются в петлях сети, что несколько затрудняет их изучение. Нити фибрина сдавливают клетки точно так же, как *in vivo* окружающие ткани сдавливают блуждающие клетки в покое; в результате морфология таких клеток весьма изменчива. Часть клеток эксплантата через некоторое время мигрирует из сгустка на прилежащую стеклянную поверхность сосуда. Наблюдать за такими клетками значительно легче, так как они свободны от фибрина и лежат в одной плоскости. Кроме того, в таком положении их форма не зависит от воздействия нитей фибрина. Однако миграция клеток требует времени, что служит лимитирующим фактором при работе с макрофагами млекопитающих, которые, не размножаясь, имеют ограниченную продолжительность жизни в культуре. Эта трудность преодолевается применением метода однослойных культур, основанного на приготовлении суспензии такой низкой концентрации, что на дне сосуда образуется один слой клеток. Этот метод дает возможность исследовать отдельные клетки и взаимоотношения между ними в нормальных и измененных экспериментальных условиях.

Независимо от источника клеток живые макрофаги в неактивном состоянии, суспендированные в жидкой питательной среде, имеют форму шара (подобно моноцитам циркулирующей крови) диаметром 15—25 мкм. С помощью фазово-контрастного микроскопа можно видеть, что ядро содержит одно ядрышко, обычно овальное или почковидное, и довольно рыхлую сеть хроматина. Хроматин бывает иногда более компактным, и тогда ядро соответственно меньше и обычно более округлое. Ядро расположено в клетке эксцентрично. Если оно почковидное, то выемка обращена в сторону дальней стенки клетки. В цитоплазме видны небольшие вакуоли, аморфные гранулы и центросома; последняя представляет собой расположенное около ядра крупное тельце, которое непрерывно совершает колебательные движения. Если ядро почковидное, то центросома лежит в участке цитоплазмы, прилежащем к выемке.

На хорошо фиксированных и окрашенных препаратах цитоплазма несколько базофильна. На них видно, что

центросома содержит две отдельные центриоли и окружена аппаратом Гольджи, около которого расположена большая часть митохондрий. Электронная микроскопия выявляет в цитоплазме многочисленные лизосомы, которые, как известно, содержат различные гидролазы — кислую фосфатазу, катепсин, дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу, различные эстеразы, а также липазу.

Макрофаги человека, кошки, мыши, кролика, крысы и других млекопитающих очень легко отличить от всех других клеток, если воспользоваться методом импрегнации серебром [12, 13]. Применение этого метода при выращивании клеток на «летающих» покровных стеклах весьма полезно для точного распознавания макрофагов в культурах, содержащих другие типы клеток (обзор соответствующей литературы и подробное описание методов можно найти в работе Маршалла [14]).

После того как живые макрофаги, суспендированные в жидкой питательной среде, прикрепляются к стеклянной поверхности сосуда, они постепенно утрачивают сферическую форму, становятся более или менее уплощенными, «выпускают» многочисленные короткие отростки, напоминая при этом блуждающие клетки в покое. Прикрепление к стеклу происходит через 2—3 ч после посева. Сила их адгезии удивительно велика (вероятно, она больше, чем у всех других клеток в аналогичных условиях). Такие культуры можно тщательно промывать, вовсе не рискуя смыть клетки. Процесс прикрепления клеток происходит особенно быстро при температуре тела и подавляется охлаждением. Если клетки прикрепляются к поверхности, несмачиваемой водой (например, большинство пластиков), то для этого требуется в 6 раз больше времени.

У прикрепившихся клеток выявляется характерная для макрофагов структура — «ундулирующая мембрана», описанная Каррелем [15]. Эта структура, которая хорошо различима в фазово-контрастном микроскопе, представляет собой узкий, совершенно прозрачный и сильно истонченный наружный край цитоплазмы уплощенной клетки; образуя складки наподобие волана, край этот находится в непрерывном ундулирующем движении. Когда клетка не движется, в разных участках края

вновь и вновь образуются и втягиваются многочисленные псевдоподии. Каждый из этих образующихся прозрачных выростов ограничен на конце ундулирующей мембраной. При амебоидном движении в направлении движения выбрасывается одна длинная псевдоподия, затем вся клетка вытягивается; ундулирующая мембрана окаймляет лишь передний край псевдоподии.

В однослойных культурах форма клеток варьирует в зависимости от расстояния между ними, а также от возраста культуры. В молодых культурах в отсутствие «перенаселения» и стимула к миграции клетки находятся в состоянии покоя или случайного движения. Находясь в покое, клетки вытягивают несколько псевдоподий, причем некоторые из них очень длинные и тонкие; на конце всех псевдоподий имеется ундулирующая мембрана. Иногда отдельные длинные псевдоподии могут подвергаться клазмацитозу. Если плотность клеток высока и они соприкасаются друг с другом, то, образуя многочисленные короткие отростки, клетки остаются неподвижными, хотя складчатый край псевдоподий продолжает совершать постоянные движения. В этих условиях клетки имеют тенденцию прилипать друг к другу, причем настолько крепко, что их удается снять со стенки сосуда в виде сплошного «эпителиоидного» пласта. Такое прочное соединение, вероятно, обусловлено переплетением псевдоподий соприкасающихся клеток; *in vivo* подобная картина характерна для макрофагов, выстилающих кровеносные синусоиды. В старых «перенаселенных» культурах некоторые эпителиоидные клетки могут сливаться друг с другом, образуя гигантские клетки.

При амебоидном движении макрофага, направленном в сторону фагоцитируемой частицы, вытягивается одна большая псевдоподия, как и при случайном движении, но, кроме того, вся мембрана выбрасывает многочисленные постоянно меняющиеся отростки. После приближения клетки частицы оказываются между двумя короткими псевдоподиями и как бы погружаются в цитоплазму клетки, находясь в вакуоле, где происходит ее переваривание. Частица, не поддающаяся перевариванию, сохраняется в клетке неопределенно долго. Если погло-

щается много вещества, то либо оно, либо продукты его расщепления накапливаются в клетке, в результате чего последняя сильно увеличивается. Механизмы фагоцитоза и переваривания у макрофагов подробно исследованы с помощью электронного микроскопа; соответствующее описание можно найти в монографиях по структуре клеток, например у Тонера и Карра [16].

ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ МАКРОФАГОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Из сказанного ясно, что источником макрофагов могут служить многие ткани животных. Действительно, эти клетки всегда можно обнаружить на ранних этапах культивирования кусочков разных тканей, взятых у разных животных. В чистой культуре их впервые выделили в 1921 г. Каррел и Эбелинг [17] путем эксплуатации рыхлого поверхностного слоя (buffy coat) осадка, полученного при центрифугировании крови курицы. В качестве питательной среды авторы использовали гомологию плазму, содержащую экстракт тканей эмбриона. Это удалось не только благодаря тщательности эксперимента, но и потому, что крупные одноядерные лейкоциты (макрофаги) крови птиц в отличие от других типов птичьих лейкоцитов способны к размножению и длительному существованию в искусственной среде. Это дало возможность в результате последовательных пересевов освободить культуру от примеси других клеток. Каррел и Эбелинг поддерживали культуру макрофагов в хорошем состоянии в течение 3 мес. Они исследовали их морфологию, способность к амебоидному движению и фагоцитозу, а также их реакции на изменения состава культуральной среды.

Поскольку многие работы, выполненные на макрофагах, имеют отношение к проблемам физиологии и патологии человека, желательно проводить такие исследования на культурах макрофагов человека или по крайней мере на макрофагах млекопитающих. Попытки выполнить это требование сразу же наталкиваются на трудности, связанные с тем, что, хотя макрофаги млекопитающих сохраняют жизнеспособность в искусствен-

ной среде, заставить их размножаться в этих условиях до сих пор не удавалось (имеется 1—2) сомнительных исключения). Вероятно, это обусловлено не методикой культивирования, а тем, что и *in vivo* нормальные дифференцированные макрофаги не способны к размножению. Какова бы ни была истинная причина этого явления, оно стимулировало поиски таких источников макрофагов, из которых можно было бы получить достаточно макрофагов при минимальном числе клеток других типов без риска загрязнения культуры микроорганизмами.

Оказалось, что среди доступных для анализа наиболее пригодны клетки следующих млекопитающих (расположены в порядке убывания): мыши, кролика, человека, морской свинки, крысы. Найти ткань, практически пригодную в качестве источника макрофагов, не так легко. В ряде тканей содержится мало макрофагов — достаточно серьезный недостаток, поскольку в культуре эти клетки не размножаются. В материале из некоторых тканей неизбежна примесь других клеток; порой это не столь важно, иногда же для освобождения от этих клеток приходится прибегать к весьма сложным приемам. Ткань иногда так неудачно расположена, что для получения «чистого» материала, свободного от микроорганизмов, приходится изыскивать особые методы.

Для иллюстрации сказанного рассмотрим кратко те «за» и «против», которые приходится учитывать при выборе того или иного из используемых обычно источников, включая те, которые обеспечивают приемлемый компромисс и которые подробно описаны ниже.

Доступным источником макрофагов может служить цельная кровь. Ее легко взять с соблюдением правил асептики, однако методика отделения макрофагов (моноцитов) от других клеток сложна и выход макрофагов довольно мал. Много макрофагов содержится в кровяной ткани костного мозга, однако, как и при использовании в качестве источника других солидных тканей, получить из ткани костного мозга однослойную культуру клеток можно лишь за счет миграции их из эксплантатов; поэтому в таких культурах неизбежна примесь фибробластов, которые, размножаясь, постепенно вытесняют макрофаги.

Перитонеальные транссудаты большинства млекопитающих содержат макрофаги. Особенно много этих клеток в транссудатах у мыши и морской свинки, однако наряду с макрофагами там присутствуют самые разнообразные их предшественники, а также лимфоциты, эозинофильные полиморфноядерные лейкоциты и тучные клетки. Перитонеальный транссудат — это наиболее широко используемый источник макрофагов, поскольку его можно получить путем вымывания, соблюдая асептические условия, а от примеси посторонних клеток легко освободиться. Между мышами и морскими свинками в этом отношении нет различий, но, так как мыши дешевле, обычно пользуются ими.

В качестве практической рекомендации для увеличения содержания макрофагов в перитонеальной жидкости можно предложить внутрибрюшинную инъекцию чужеродных веществ обычно за несколько дней до вымывания жидкости. Используются разные вещества: при работе на мышах — крахмал [18], казеинат натрия [19] и тиогликолатная среда Difco [20]; в опытах на морских свинках — гликоген [21]. Подобное воздействие применяется и на других животных, например на кроликах — гликоген [22], легкое или тяжелое минеральное масло [23, 24] и жидкий парафин [25]; на крысах — гликоген печени кролика [26], бульон из бычьего сердца с добавлением протеозного пептона Difco [23] и протеозный пептон [27]. Подобное воздействие значительно увеличивает выход макрофагов, особенно при использовании тех животных, у которых в норме перитонеальный транссудат не очень богат этими клетками. Не известно, однако, будут ли макрофаги, полученные после такого воздействия *in vivo*, нормально реагировать на разнообразные агенты в культуре. Кроме того, существует приводимый ниже метод получения высокого выхода перитонеальных макрофагов мышей и без применения дополнительных воздействий.

Хорошим источником макрофагов может служить жидкость, взятая из брюшной полости у больных при перитонеальном диализе по поводу хронической почечной недостаточности. Такая жидкость содержит много макрофагов и обычно свободна от других клеток.

Само собой разумеется, что использование этого источника макрофагов ограничено, так как он доступен лишь лабораториям, расположенным вблизи клинических центров, где проводится терапия диализом. Правда, это ограничение постепенно отпадает, поскольку таких центров становится все больше — в настоящее время они созданы в большинстве учебных клиник и при многих крупных больницах. Стало быть, вполне возможно, что применение указанного источника макрофагов будет расширяться, и потому вовсе не лишними будут здесь некоторые предостерегающие замечания относительно опасностей, связанных с его применением. В случаях хронической почечной недостаточности иммунные механизмы подавлены, и полагают, что такие больные часто бывают постоянными носителями возбудителя сывороточного гепатита даже в отсутствие явных клинических симптомов этой болезни. Этот возбудитель находится в крови и загрязняет аппаратуру, используемую для диализа, а так как он отличается высокой инфекционностью и обычно термостабилен, то опасен не только для других больных, но и для всех, кто работает с кровью и с перитонеальным диализатом и кто обслуживает аппаратуру. Так как сывороточный гепатит нередко протекает очень тяжело и иногда приводит к летальному исходу в остром периоде или переходит в хроническую форму, вызывая тяжелое поражение печени, при работе с перитонеальным диализатом следует соблюдать сугубую осторожность (соответствующие меры описаны ниже).

Много свободных макрофагов присутствует в легких (альвеолярные макрофаги). Мирвик и др. [28] предложили сравнительно простой метод их получения путем смывов из альвеол и воздухоносных путей кролика. Мы не применяли этот метод сами, но у нас создалось впечатление, что, хотя он не лишен ряда недостатков, на которые мы укажем позже, этот метод позволяет получить вполне пригодный материал с высоким выходом макрофагов; посторонних клеток в нем мало, и, кроме того, они представлены главным образом нейтрофильными полиморфноядерными лейкоцитами, от которых легко избавиться.

Получение макрофагов из трех упомянутых выше источников, а именно из брюшной полости мыши и человека и из легких кролика, а также методика культивирования этих клеток подробно описаны в соответствующих разделах.

АППАРАТУРА И МАТЕРИАЛЫ

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Все, с чем непосредственно или косвенно соприкасаются клетки или среда, должно отвечать строгим требованиям чистоты и стерильности, обязательным при работе с культурой ткани.

Стеклянную посуду моют детергентами, например пиронегом (Pyronex), а затем тщательно несколько раз промывают бидистиллированной (в стеклянном дистилляторе) или деионизованной водой. Подложки из белка и других веществ, на которых выращивают клетки, удаляют со стенок сосудов ершиком. Выполнять это следует очень тщательно, так как клетки имеют тенденцию мигрировать вдоль полосок субстрата, оставляемых ершиком, в результате чего создается ошибочное представление о каком-то особом типе распределения клеток (рис. 5.1). Не следует использовать для мытья посуды такие вещества, как, скажем, хромовую кислоту, поскольку ее трудно удалить полностью. Желательно, чтобы вся стеклянная посуда, которую приходится часто мыть, была изготовлена из боросиликатного стекла, которое не подвергается коррозии под влиянием фосфатов, присутствующих во многих детергентах.

Неравномерное распределение клеток по стенке сосуда может быть также следствием царапин на стекле (рис. 5.2) или зазубрин на пластике, поэтому поверхность, на которой будут расти клетки, следует тщательно осмотреть. Для пробок и прокладок лучше всего использовать силиконовую резину. Пригодна также нетоксичная белая резина, которая дешевле силиконовой, однако она быстрее разрушается при стерилизации нагреванием.

Стеклянную посуду предпочтительнее стерилизовать не в автоклавах, а в сушильных шкафах (сухим жаром)

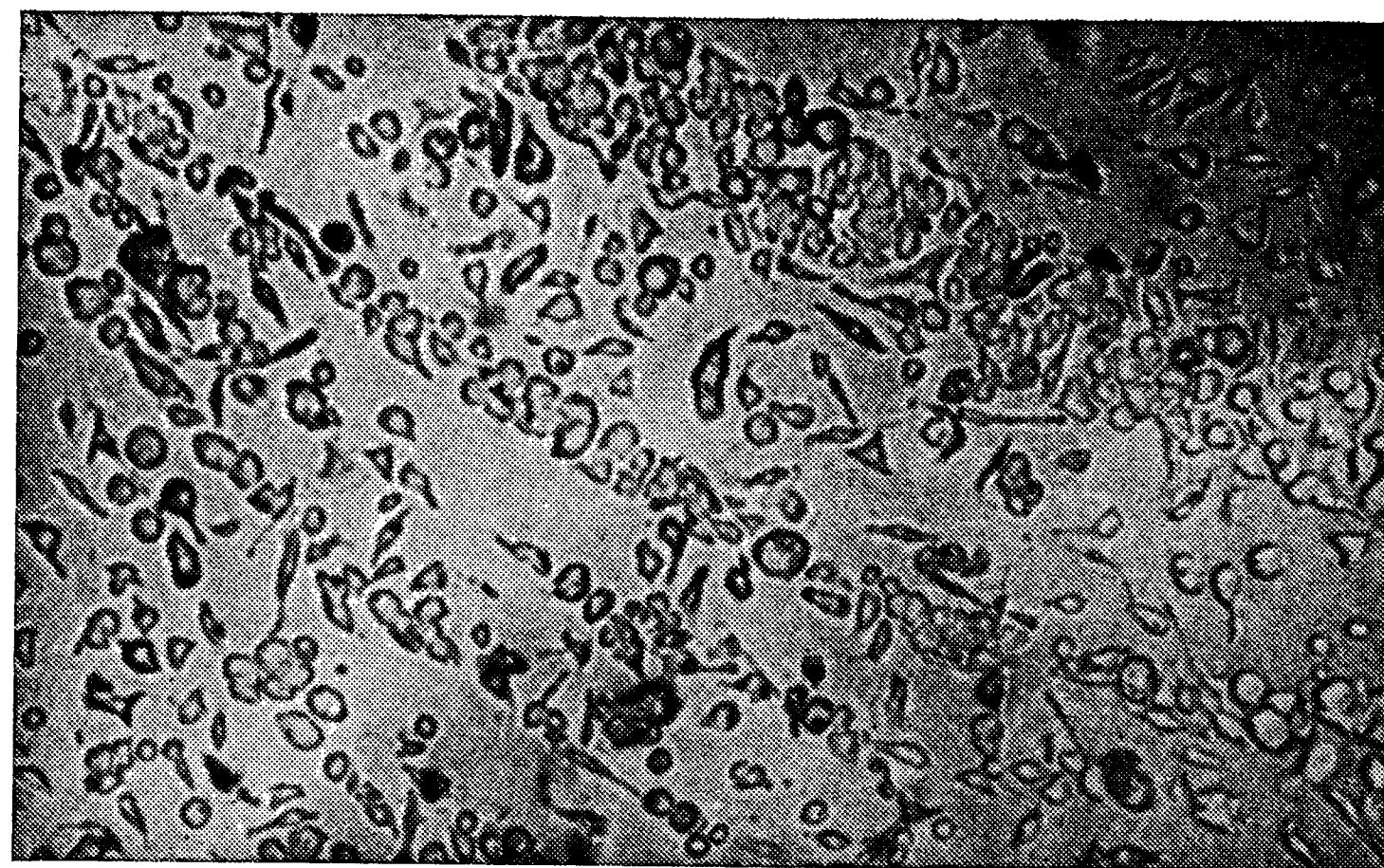


Рис. 5.1. Влияние на распределение клеток посторонних веществ, оставшихся после мойки на стенке сосуда; об. 10 X, ок. 8 X.
Микрофотография живых клеток культуры перитонеальных макрофагов мыши на стенке пробирки.

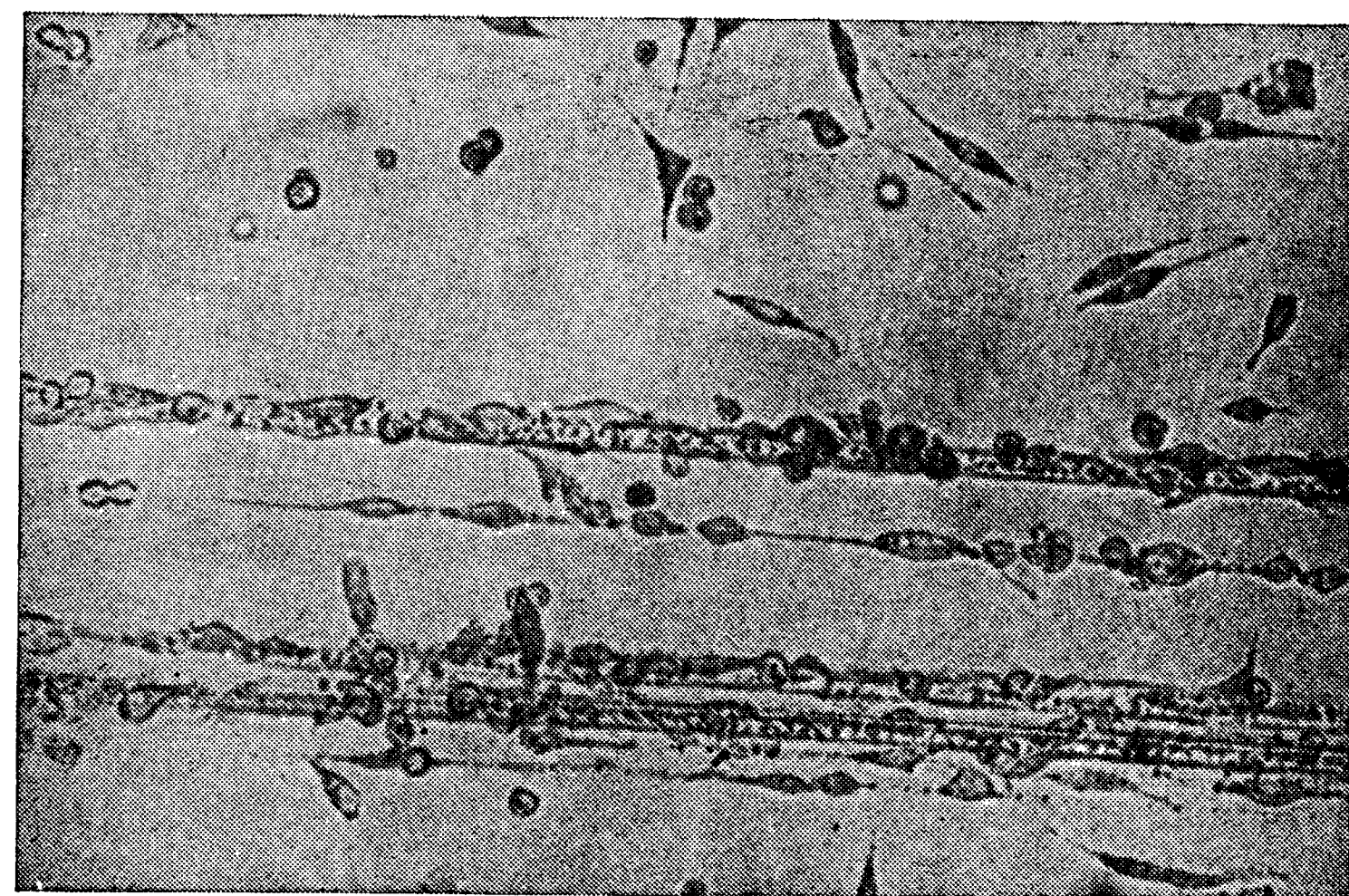


Рис. 5.2. Влияние на распределение клеток царапин, оказавшихся на поверхности покровного стекла камеры Стерилина; об. 10 X; ок. 8 X.

Микрофотография живых перитонеальных макрофагов мыши; покровное стекло не было тщательно осмотрено перед употреблением. Обратите внимание, что качество изображения лучше, чем на рис. 5.1.

при 180°C в течение полутора часов. Дело в том, что вода в автоклавах нередко содержит примеси, которые осаждаются на стенках стерилизуемых сосудов; это опять-таки создает субстрат, ведущий к артефакту распределения.

Силиконовая резина выдерживает повторную стерилизацию сухим жаром и при этом сохраняется значительно дольше, чем белая. Последнюю лучше стерилизовать другим способом, а именно автоклавированием (10 мин). При таких условиях она дольше сохраняется.

Различные камеры, сделанные из пластика, стерилизуют γ -излучением непосредственно в процессе изготовления; это камеры одноразового пользования. Другие камеры стерилизуют погружением на 30 мин в 70%-ный спирт, приготовленный путем разведения абсолютного спирта бидистиллированной или деионизованной водой; затем четырежды споласкивают водой такой же очистки, высушивают на воздухе в стерильных камерах и облучают 30 мин ультрафиолетом, пользуясь бактерицидной лампой Филлипса.

СОСУДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Существуют различные типы сосудов — от обычных круглодонных стеклянных пробирок до специально сконструированных камер.

Пробирки

Для многих работ вполне пригодны обычные пробирки. Они дешевы, просты в обращении, после использования легко моются и стерилизуются.

Пробирки, желательно из боросиликатного стекла, должны быть 100 мм длиной и 12 мм в диаметре; закрывают их резиновыми пробками. При использовании пробок из силиконовой резины пробирку стерилизуют в сушильном шкафу вместе с неплотно закрытыми пробками.

В каждую пробирку помещают 1,0 мл культуральной среды, содержащей клетки в соответствующей концентрации; пробирку заполняют стерильным воздухом, со-

держащим около 5% CO_2 ¹. Закрыв пробирки пробками, помещают их в специальные штативы, в которых они находятся под углом 3° к горизонтали. Верхнюю часть каждой пробирки в штативе помечают около пробки восковым карандашом. Через 2—3 ч инкубации клетки и среди них макрофаги прикрепляются к нижней поверхности пробирки и образуют монослой, так что при необходимости пробирку можно повернуть на 180°. Макрофаги исследуют с помощью обычного или фазово-контрастного микроскопа, снабженного длиннофокусным конденсором. После исследования пробирку помещают в штатив карандашной пометкой кверху, чтобы клетки снова оказались погруженными в среду.

Не следует забывать о том, что при исследовании клеток в пробирках, стенки которых отличаются кривизной и неравномерной толщиной, качество изображения страдает. Кроме того, толщина стенки пробирок ограничивает свободное рабочее расстояние объектива микроскопа, поэтому нельзя использовать объективы с увеличением более 10 $\times$.

Несмотря на эти недостатки, такой простой способ наблюдения весьма полезен, поскольку для многих экспериментов необходима лишь общая оценка состояния культуры, а это легко выполнимо. В тех случаях, когда требуется более детальное микроскопическое исследование или необходимо получить высококачественные микрофотографии живых клеток, лучше использовать для культивирования не пробирки, а камеры с прозрачными, тонкими, плоскими параллельными стенками (ср. качество изображения на рис. 5.1 и 5.2).

Работая с обычными пробирками, можно в качестве дополнения использовать кусочек покровного стекла такой ширины, чтобы его можно было легко вложить в пробирку и извлечь из нее. При заливке инокулированной среды в такую пробирку некоторые макрофаги оседают и прикрепляются к верхней поверхности «летающего» покровного стекла, которое можно извлечь на той или иной стадии культивирования, прикрепившиеся

¹ В процессе культивирования эту процедуру следует время от времени повторять, руководствуясь цветом индикатора.

клетки зафиксировать, окрасить, заключить на предметном стекле и получить препарат для микроскопического исследования. Клетки, оставшиеся на стенке пробирки, при желании можно продолжать культивировать.

Некоторые авторы предпочитают использовать для культивирования пробирки Лейтона (рис. 5.3). Они отличаются от обычных тем, что на одной из сторон нижнего конца пробирки отштампована удлиненная плоская

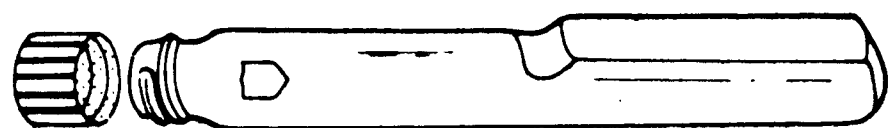


Рис. 5.3. Пробирка Лейтона.

площадка («окошко»). Такие пробирки бывают разных размеров и иногда с завинчивающимися крышками. Их инкубируют в горизонтальном положении окошком вниз. Клетки оседают на внутренней плоской поверхности и прикрепляются к ней. Микрофотографии клеток, растущих в таких пробирках, как правило, бывают хорошего качества. Однако эти пробирки дороже обычных и их труднее мыть.

Камеры

Особенностью камеры, предназначенной для культивирования макрофагов в жидкой среде, является наличие в ней хотя бы одной плоской стенки (лучше нижней, к которой прикрепляются клетки) из прозрачного материала с таким коэффициентом преломления и толщиной, которые не искажают изображения при микроскопическом исследовании. Во всех предложенных до сих пор разновидностях камер это основное требование удовлетворялось применением в качестве одной из стенок покровного стекла. Весьма желательно, чтобы противоположная стенка была из такого же материала, располагалась параллельно той стенке, на которой растут клетки, и близко от нее (особенно, если приходится работать с обычным конденсором). Очень немногие камеры удовлетворяют всем этим требованиям, но даже в

тех из них, которые могут им соответствовать, по чисто техническим причинам нижняя стенка самой камеры всегда находится на некотором расстоянии от нижней поверхности корпуса, в который вмонтирована камера, и потому приходится применять специальные длиннофокусные конденсоры. Но даже при работе с таким конденсором лучше, чтобы верхняя и нижняя стенки камеры были расположены близко друг к другу; в наиболее удачных моделях расстояние между ними не превышает 1 мм.

Кроме улучшения оптических качеств, в конструкцию некоторых камер были внесены и другие усовершенствования, благодаря чему время поддержания культур в камерах удалось довести до 2—3 нед. В усовершенствованных вариантах имеется дополнительное пространство, окружающее растущие клетки, которое обеспечивает газообмен. Это «газовое пространство», как его называют, сообщается через специальные каналы с внешней средой, что позволяет регулировать состав атмосферы в камере без риска инфицировать культуру. Через те же или дополнительные каналы в камеру можно вводить иглы, с помощью которых осуществляют посев клеток и смену среды. В наиболее усовершенствованных камерах возможен постоянный контроль за составом среды и атмосферы. Доступ в «газовое пространство» и к клеткам в таких камерах, а также их высокие оптические качества, позволяющие проводить длительные микроскопические наблюдения над живыми клетками, дают возможность исследовать влияние на клетки разнообразных веществ, жидких и газообразных, в растворе или в суспензии. Две такие камеры (исходная модель и фирменная модификация) будут описаны ниже.

Камера Тревана и Робертса и камера Приора. Камера Тревана и Робертса¹ [29], хотя и имеет довольно сложную конструкцию и требует применения длиннофокусного конденсора (нижняя стенка камеры находится

¹ Эта камера в несколько модифицированной форме под названием Prior Tissue Culture Chamber выпускается фирмой W. R. Prior and Co. Ltd., London Road, Bishop's Stortford, Hertfordshire.

на расстоянии 4,4 мм¹ от нижней поверхности пластины), проста в обращении и дает возможность проводить самые разнообразные исследования. Первоначально ка-

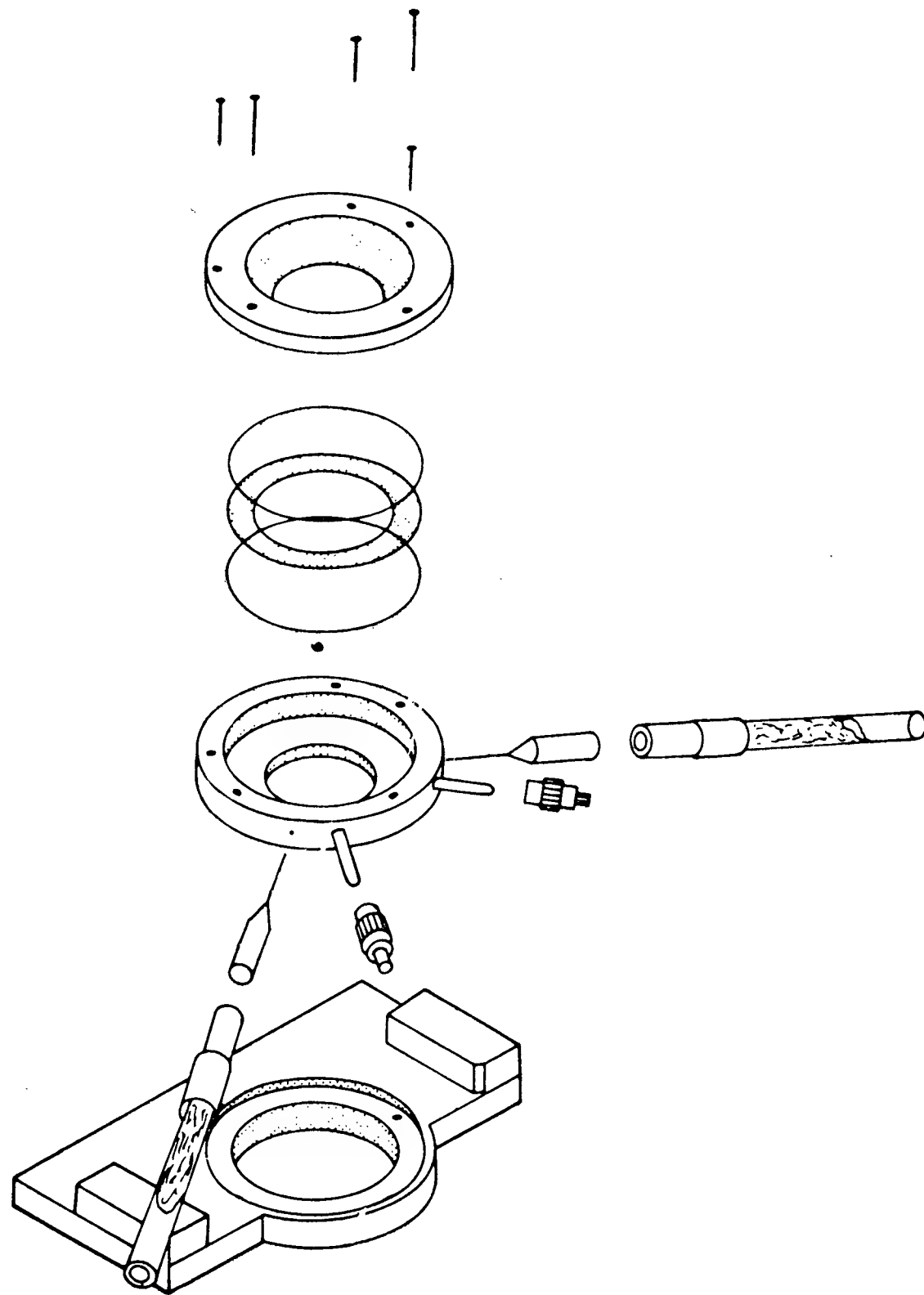


Рис. 5.4. Рисунок камеры Тревана и Робертса с газовыми иглами и фильтрами.

мера была задумана для работы с инвертированным микроскопом, но она вполне пригодна и при работе с обычным микроскопом. Однако в этом случае в пер-

¹ В модификации Приора — 4,9 мм.

вые несколько часов инкубации камеру следует держать перевернутой. При возвращении камеры в исходное положение клетки, прикрепившиеся к верхней стенке, можно наблюдать в обычный микроскоп.

Камера предназначена для многократного использования; ее можно полностью разобрать и тщательно вымыть. Она состоит из двух круглых покровных стекол диаметром 32 мм, образующих верхнюю и нижнюю стенки, отделенные друг от друга расстоянием 2 мм (около 1,9 мм в первоначальном варианте и около 2,2 мм в камере Приора) с помощью круглого кольца из силиконовой резины. Покровные стекла и резиновое кольцо находятся между двумя кольцевыми пластинками из алюминиевого сплава с наружным диаметром примерно 40 мм. Верхняя и нижняя пластинки скрепляются тонкими шурупами (рис. 5.4). Перед работой на периферическую часть внутренней поверхности каждого покровного стекла наносят силиконовую смазку, оставляя в центре чистый кружок диаметром около 10 мм. При посеве среда и клетки занимают только этот центральный кружок, а свободная периферическая часть служит газовым пространством.

Нижняя металлическая пластинка снабжена двумя радиально расположенными суживающимися к концу трубочками из нержавеющей стали, на концы которых надеваются плотно пригнанные колпачки с накаткой из алюминиевого сплава. В исходной модели эти трубочки расположены под углом 60°, а в модификации Приора (рис. 5.5) — напротив друг друга (что создает определенные трудности при работе, о которых будет сказано ниже). Желательно как при снятии, так и при надевании вращать их только по часовой стрелке, чтобы не ослабить трубочки. Каждый колпачок (в модификации Приора) имеет на наружном конце две параллельные площадки, чтобы его удобно было захватить пинцетом. Диаметр просвета трубочки чуть меньше глубины камеры. Каждая трубочка расположена таким образом, что ее внутреннее отверстие, диаметр которого почти полностью совпадает с промежутком между покровными стеклами, упирается в резиновое кольцо. Для посева клеток и смены среды используют иглу длиной 38 мм и диа-

метром 0,55 мм; ее проводят через одну из трубочек (назовем их направляющими) к резиновому кольцу и прокалывают резиновое кольцо. Благодаря эластичности резины место прокола по извлечении иглы полностью закрывается. При необходимости эту операцию можно производить многократно. Для постоянной перфузии культуры используют обе трубочки.

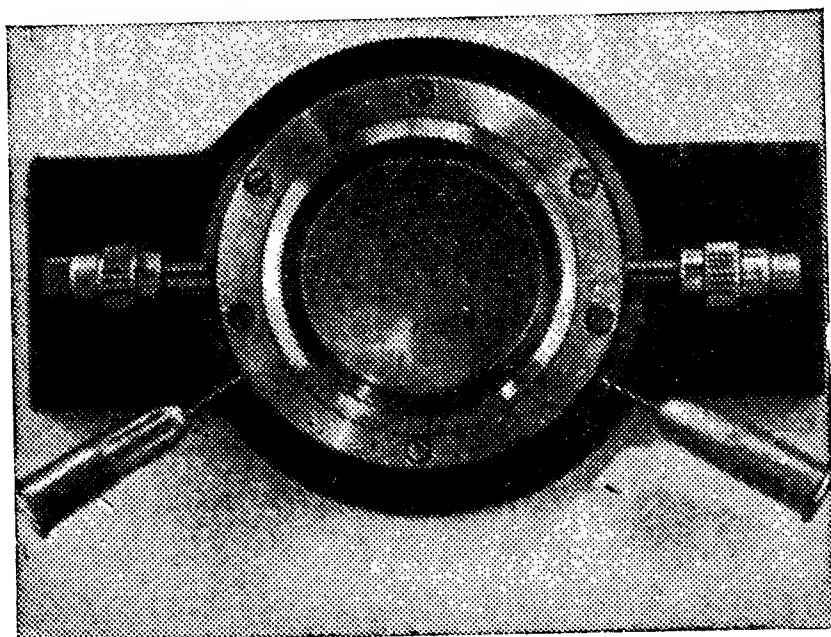


Рис. 5.5. Вид камеры Приора, вмонтированной в основную пластину. В камеру вставлены газовые иглы, которые должны иметь металлические наколечники, чтобы выдержать стерилизацию сухим жаром.

В нижней пластинке, кроме того, имеется два радиально расположенных отверстия, которые лежат в той же плоскости, что и направляющие трубочки. В исходной модели они расположены симметрично по отношению к последним и под углом 100° друг к другу (рис. 5.4), в камере Приора они также лежат симметрично по отношению к направляющим трубочкам, но между ними и под углом 115° друг к другу (рис. 5.5). Через эти отверстия проводят иглы (длиной 13 мм и диаметром 0,55 мм) в периферическую часть камеры — в газовое пространство. Эти иглы, которые находятся в камере постоянно в течение всего периода культивирования, снабжены ватным фильтром от пыли и служат для поддержания постоянного давления в камере, что особенно важно при введении и удалении жидкости из центральной части камеры. С их помощью можно поддерживать физиологический оптимум состава атмосферы

в газовом пространстве, а также вводить в него экспериментальную смесь газов (назовем их газовыми иглами).

Камеру помещают в чашку Петри и стерилизуют в собранном виде (вместе со смазанными покровными стеклами, газовыми иглами, на концы которых одевают маленькие стеклянные трубочки, и зажимными винтами, которые, однако, не должны быть затянуты; их затягивают лишь после того, как камера остынет). Ватные фильтры, помещенные в короткие поливиниловые или стеклянные трубки, стерилизуют отдельно в автоклаве, а затем соединяют с газовыми иглами. Камера вмонтирована в металлическую пластину (рис. 5.4). В собранную таким образом камеру помещают клетки для культивирования. В небольшой стерильный шприц с иглой длиной 38 мм и диаметром 0,55 мм набирают клетки, суспендированные в питательной среде, в определенной концентрации. Колпачок одной из трубочек обжигают в пламени горелки и снимают; также обжигают конец трубочки и проводят в него иглу, чтобы кончик ее достиг центральной части камеры. Благодаря зазору между стенками трубочки и иглой, а также эластичности резины можно, манипулируя шприцем, коснуться кончиком иглы любого из покровных стекол (необходимо соблюдать осторожность, чтобы случайно не поцарапать стекло). Обратив скос иглы вверх и подводя ее ближе к верхнему стеклу, выпускают немного суспензии, так чтобы на верхнем покровном стекле возникла висячая капля. Постепенно количество суспензии, заполняющей камеру, увеличивают, пока капля не коснется нижнего покровного стекла. Для того чтобы целиком покрыть несмазанную центральную часть обеих стенок камеры и таким образом заполнить ее, для камеры Тревана и Робертса требуется 0,2 мл суспензии, а для камеры Приора — около 0,25 мл. (Следует отметить, что введение суспензии не увеличивает давления в камере, поскольку она связана с окружающей средой через газовые иглы.) Заполнив камеру, извлекают трубочку и колпачок, снова обжигают и трубочки закрывают колпачком. Камеру помещают в стерильный контейнер для инкубации.

При пользовании обычным микроскопом вначале камеру инкубируют в перевернутом положении, чтобы клетки оседали на верхней стенке. Через 2—3 ч макрофаги прикрепляются, и инкубацию можно продолжать при обычном положении камеры.

Когда камера прогреется до температуры термостата, примерно ко времени прикрепления макрофагов, ее заполняют газом. Это можно производить периодически (как при культивировании клеток в пробирках), или непрерывно. В первом случае через одну из газовых игл с фильтром подают теплую газовую смесь, а содержимое газового пространства (сначала это воздух) выпускают через другую иглу; затем подачу газа на некоторое время прекращают и продолжают инкубацию. При непрерывном заполнении газовую смесь перед введением в камеру насыщают водяным паром и прогревают, пропуская через промывалку при температуре на несколько градусов выше температуры камеры. Выпускную иглу соединяют с трубкой, которую погружают в неглубокий сосуд с водой, что позволяет непосредственно наблюдать за поступлением газа и поддерживать в камере постоянно небольшое избыточное давление. При таком способе система газовых игл обеспечивает постоянное поддержание оптимальной физиологической атмосферы в газовом пространстве. С равным успехом ее можно использовать для создания в газовом пространстве особой «экспериментальной» атмосферы.

Периодическая смена среды и добавление в культуру различных агентов осуществляются через те же трубочки. Эти операции следует выполнять очень осторожно, чтобы не повредить прикрепившиеся клетки. Для постоянной перфузии культуры нормальной или специально измененной средой одновременно используются обе трубочки. Перфузию осуществляют, нагнетая или отсасывая среду при помощи небольшого перепада давления; важно только, чтобы скорости притока и оттока были одинаковыми.

После окончания культивирования верхнее покровное стекло снимают, прикрепившиеся клетки фиксируют и окрашивают для микроскопического исследования, как при использовании покровных стекол.

Выше уже упоминалось, что в камере Приора направляющие трубочки расположены по концам диаметра, напротив друг друга, тогда как в исходной модели они находятся под углом 60° ; было отмечено, что подобная модификация связана с определенными трудностями при работе. Очевидно, что расположение трубочек в камере Приора способствует более равномерному распределению жидкости при постоянной перфузии и в этом отношении представляется усовершенствованием. Однако, когда камера вмонтирована, направляющие трубочки лежат прямо на пластине (рис. 5.5), и ясно, что при минимальной высоте установки зазор между колпачками трубочек и пластиной очень мал. Это обстоятельство несколько затрудняет снятие и надевание колпачков и, что более серьезно, может привести к перегреву камеры при пользовании пламенем для обжигания трубочек и колпачков. Легко видеть, что при работе с исходной моделью, где трубочки расположены по-иному и форма основания другая (рис. 5.4), подобные трудности не возникают.

Для того чтобы избежать опасности перегрева в камере Приора, стерилизуемые поверхности обводят невысоким, но горячим пламенем, направляя его в сторону от самой камеры.

Такое подробное описание камеры было здесь дано для того, чтобы привлечь внимание ко многим ее достоинствам. Дальнейшие подробности, касающиеся применения камеры, и некоторые практические советы по работе с ней содержатся в проспектах, выпускаемых фирмой.

Камера Круикшенка, Купера и Конрана и камера Стерилина. Камера, предложенная Круикшенком и др. [30], намного проще. Принцип этой камеры в основном тот же, что и камеры Тревана и Робертса: небольшой объем культуральной среды, окруженный газовым пространством, удерживается силой поверхностного натяжения между двумя прозрачными параллельными стенками.

Исходная конструкция камеры следующая (рис. 5.6). В центральной части пластины из perspex размером $75 \times 40 \times 5$ мм (что соответствует размерам столика

микроскопа) вырезают круглую полость с плоским дном диаметром 25 мм и глубиной не более 0,75 мм. По периферии дна полости вырезают кольцевую канавку глубиной 3 мм и шириной 2,5 мм; основная часть дна полости представляет собой, таким образом, плоскую вершину короткого и толстого столбика диаметром 20 мм. Вершину столбика полируют и камеру окончательно достраивают тем, что всю полость покрывают квадратным

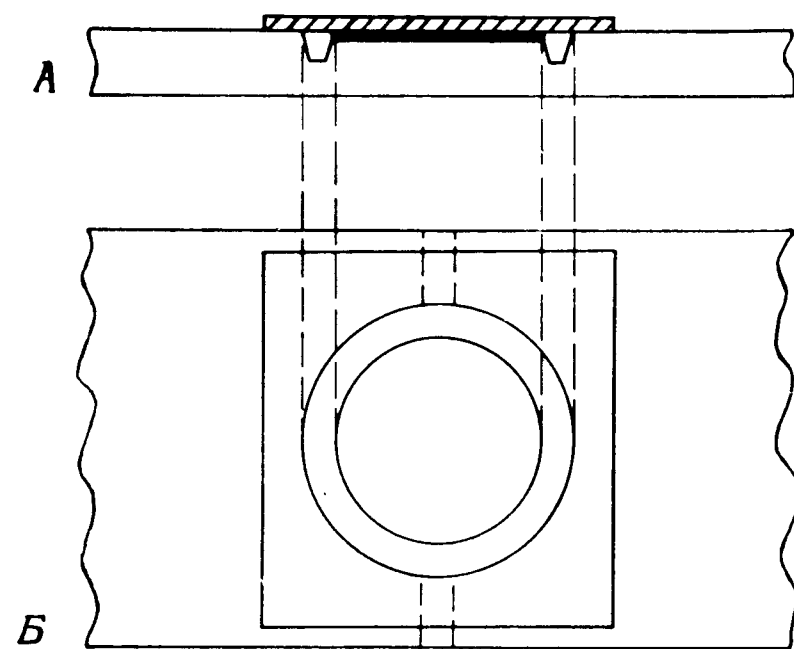


Рис. 5.6. Рисунок центральной части камеры Круикшенка, Купера и Конрана с покровным стеклом.

А. Вид сбоку. Б. Вид сверху; пунктиром показаны боковые каналы.

покровным стеклом со стороной 38 мм, которое приклеивают к пластине пчелиным воском (парафин не подходит, так как он проницаем для культуральной среды).

Силой поверхностного натяжения среда удерживается между вершиной столбика и покровным стеклом, а окружающее кольцообразное углубление служит газовым пространством. Для доступа к последнему, а также к пространству между покровным стеклом и вершиной столбика сквозь пластины просверлены каналы диаметром 3 мм, находящиеся напротив друг друга.

Пластину стерилизуют кипячением. С помощью узкого цилиндрического аппликатора на поверхность пластины вокруг полости наносят расплавленный воск и на него кладут обожженное в пламени покровное стекло. Воск распределяется под покровным стеклом до края

полости; его количество должно быть таким, чтобы обеспечить надежную герметизацию.

Пользуясь шприцем с иглой, через один из каналов вводят суспензию клеток, затем камеру заполняют газом, а отверстия каналов затыкают тампонами, смоченными в расплавленном воске. Первые несколько часов камеру инкубируют в перевернутом положении, чтобы клетки осели и прикрепились к поверхности стекла. Затем, вернув камеру в обычное положение, продолжают инкубацию. Смену среды, введение в культуру различных веществ, а также периодическое обновление состава атмосферы осуществляют через каналы, по которым возможна также и постоянная перфузия. В последнем случае в отверстия каналов вставляют маленькие резиновые пробочки, через которые проводят иглу.

Снятие с пластины покровного стекла для последующей фиксации и окрашивания клеток довольно трудно, так как затвердевший воск крошится, однако это все же можно сделать, подводя под угол стекла бритвенное лезвие. Стекло снимается легче, если вместо «чистого» воска применять смесь из равных частей низкоплавкого парафина для гистологических исследований и пчелиного воска. Такая смесь более пластична, чем «чистый» пчелиный воск и, по-видимому, непроницаема для среды.

Достоинство такой камеры состоит в том, что ее легко изготовить в лабораторных мастерских. Недостатки ее следующие. Во-первых, по сравнению с камерой Тревана и Робертса и камерой Приора в ней труднее поддерживать стерильность, поскольку нет надежного способа повторной стерилизации входов в каналы в собранных камерах. Необходимо поэтому самое строгое соблюдение асептики. Все операции с использованием каналов следует выполнять в настольном боксе, а камеру вынимать из стерильной чашки Петри только для микроскопирования. Во-вторых, материал, из которого сделана пластина, выделяет некоторые цитотоксические вещества, и для нейтрализации их эффекта приходится применять высокие концентрации сыворотки в среде, что не всегда желательно. В-третьих, толстое дно камеры (4,25 мм) ухудшает освещение даже при исполь-

зовании длиннофокусных конденсоров (более тонкие пластины деформируются при повторной стерилизации).

Камера Стерилина представляет собой усовершенствованную модификацию такой модели (Sterilin Ltd., 12 Hill Rise, Richmond, Surrey). Основные усовершенство-

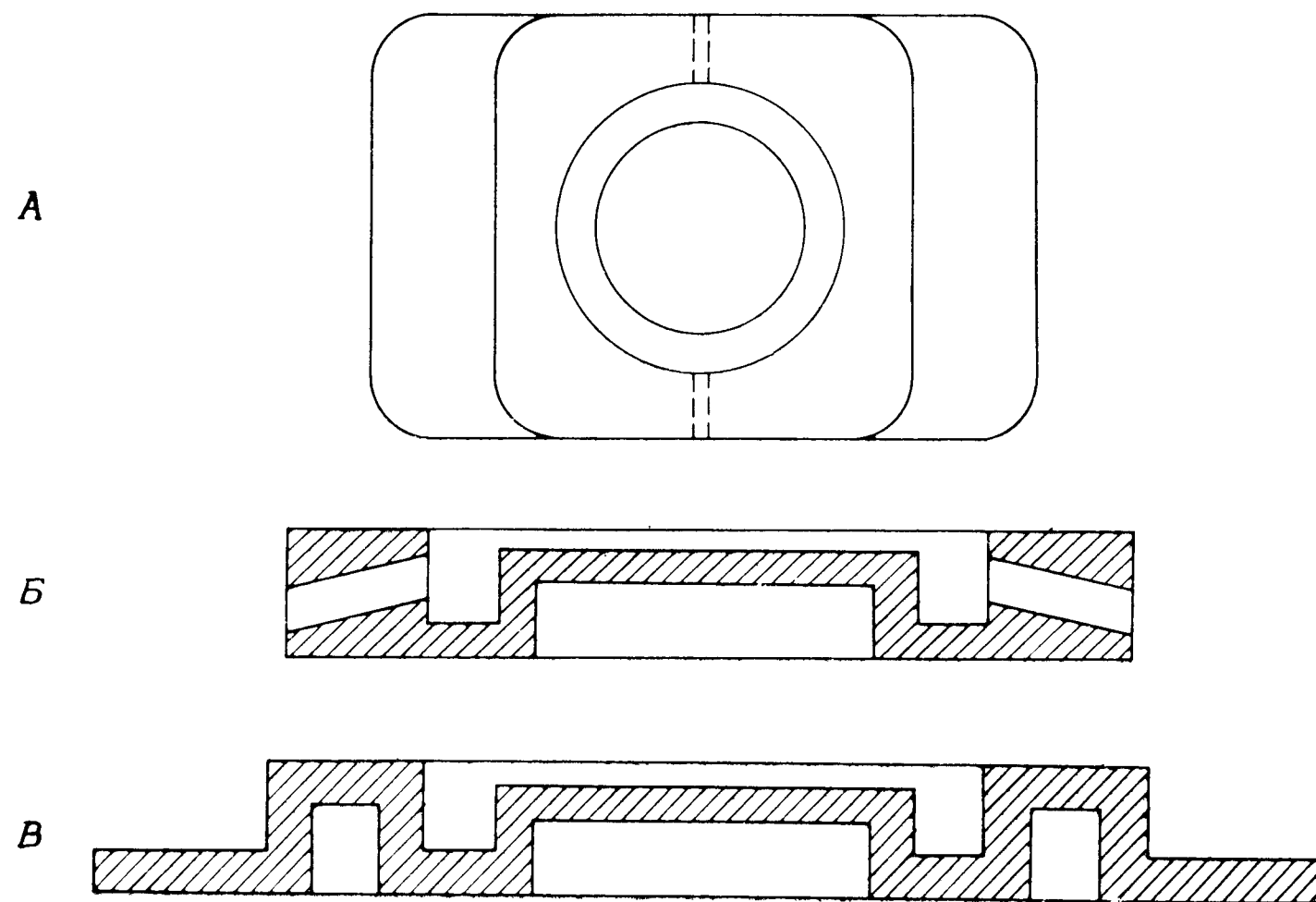


Рис. 5.7. Рисунок камеры Стерилина (без покровного стекла).

А. Вид сверху, боковые каналы показаны пунктиром (масштаб 1:1). Б. Поперечный разрез с центральным столбиком, кольцевым газовым пространством и боковыми каналами (масштаб 2:1). В. Продольный разрез; с обеих сторон видны площадки для прикрепления зажимов столбика микроскопа.

вания состоят в замене перспекса смачиваемым и нетоксичным пластиком — нуклоном и в создании полости под центральным столбиком, так что толщина камеры уменьшается до 1,4 мм (рис. 5.7), что улучшает ее оптические свойства. Кроме того, несколько изменены размеры пластины; длина и ширина ее уменьшены до 55 и 35 мм соответственно; покровное стекло представляет квадрат со стороной 32 мм. Толщина пластины там где находится камера, такая же (5 мм), но на расстоянии 10 мм от каждого конца она уменьшается за счет верхней части до 3,6 мм, благодаря чему пласти-

ну удобнее зажимать на столике микроскопа. Размеры самой камеры также несколько изменены, а именно: общий диаметр уменьшен до 23 мм, а диаметр столбика — до 17 мм; ширина и глубина кольцевого углубления увеличены до 3,0 и 3,6 мм соответственно; глубина 0,7 мм; диаметр боковых канальцев, которые идут под углом, уменьшен до 1,5 мм.

Такая модифицированная камера стерилизуется облучением; она предназначена для одноразового использования. С ней работают так же, как и с исходной моделью; мы, однако, не имеем собственного опыта использования этой камеры для постоянной перфузии.

Камера Уосли для микрокультивирования. Эта камера представляет собой ряды углублений, или лунок, штампованных в цельной пластине из пластика (рис. 5.8). Такая камера была предложена Такачи [31] для разработанного им метода микротитрования; Такачи и др. [32] использовали ее для количественной оценки связывания вируса гриппа с антителами. Сивер [33] впервые использовал множественные микрокамеры для культивирования клеток, которые применялись в тестах на подавление метаболизма. Конечную точку титрования определяли по цвету индикатора (фенолового красного), включенного в среду; микроскопическое исследование клеток не производили. Для титрования требовалась трехсуточная инкубация. Чтобы предотвратить испарение, содержимое каждой лунки покрывали тонким слоем минерального масла. Сулливан и Розенбаум [34] (опять-таки вирусологи) приспособили этот метод для однослойной культуры, так что изменения клеток можно было наблюдать в микроскоп. Пластины, которые применяли Такачи и Сивер, были сделаны из плексигласа, а лунки в них были коническими и полусферическими соответственно. Сулливан и Розенбаум использовали для культивирования клеток смачиваемый пластик, в котором были выштампованы углубления с плоским дном. Эти авторы также наносили поверх лунок слой минерального масла, и поэтому для изучения клеток приходилось пользоваться инвертированным микроскопом.

В настоящее время микрокамеры широко используются для культивирования клеток в вирусологической

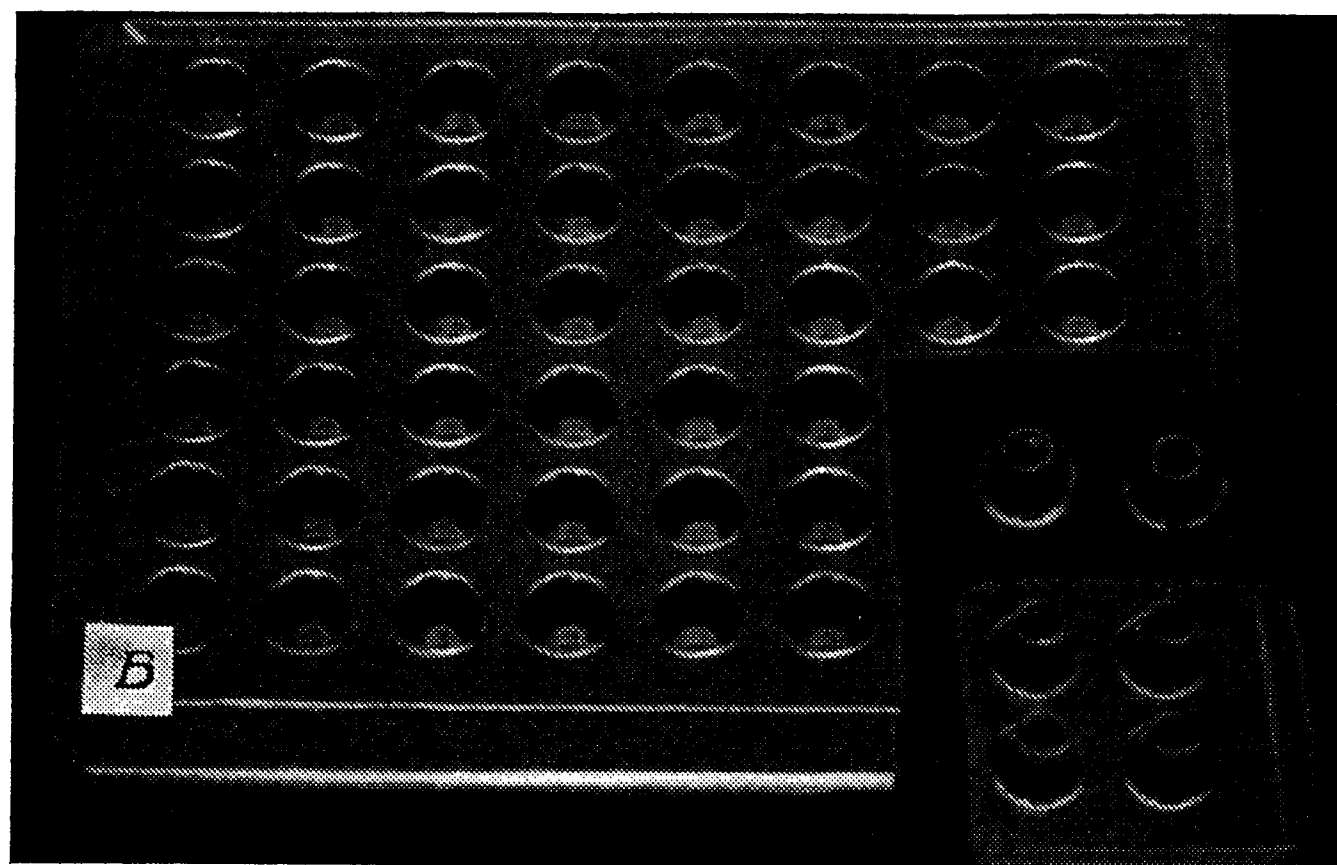
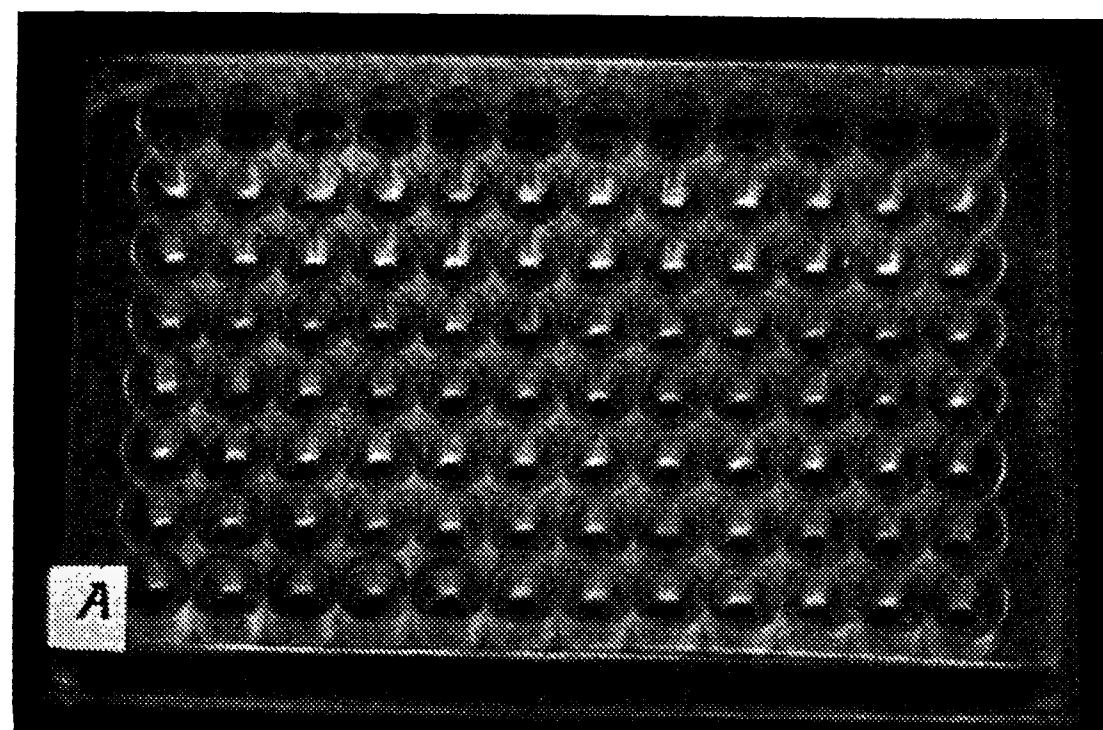


Рис. 5.8. Камера Уосли.

А. Микрокамера для культивирования из толстого пластика (тип IS-FB-96; масштаб 2/3 : 1). Б. Более тонкая пластинка, из которой вырезают пробки (тип FB-48; масштаб 2/3 : 1).

практике и для многих других целей, поэтому выпускаются пластины с самыми разнообразными углублениями. Уосли [35] нашел простой способ герметизации лунок; такие пластины можно переворачивать и рассматривать клетки, прикрепившиеся к дну лунок, в обычный

микроскоп. Плоскодонные камеры, вырезанные из пластин, выштампованных из тонкого пластика, были использованы для герметизации лунок в пластинах из более толстого пластика. Такие пластины из нетоксичного пластика выпускает фирма Linbro (Linbro Co. of New-haven, Connecticut, USA); они предназначены для однократного пользования. Тонкие пластины, из которых вырезают «пробки», имеют шифр FB-48, а толстые, которые служат камерами, — IS-FB-96 (рис. 5.8). Внутренний диаметр дна лунки примерно 5,5 мм, а объем каждой камеры с пробкой около 0,2 мл.

Микрокамеры, которые используют как пробки, вырезают ножницами вместе с окружающей плоской частью пластины, которую затем подрезают, оставляя вокруг кольцевой ободок шириной в несколько миллиметров. Ободок обеспечивает жесткость «пробки» и позволяет захватывать ее пинцетом. Пробку помещают в отверстие лунки и прижимают пинцетом. Особого давления для герметичности не требуется и при необходимости пробку легко извлечь. Чтобы между ободками соседних пробок оставался зазор, в каждом ряду используют лунки через одну, так чтобы напротив используемых лунок одного ряда были пустые лунки соседнего. Таким образом, в пластине, содержащей 8 рядов по 12 лунок в каждом, одновременно используется 48 лунок.

Перед употреблением пластины с камерами и пробки погружают на 30 мин в абсолютный спирт, разбавленный бидистиллированной водой (до 70%), затем четырежды промывают бидистиллированной водой, высушивают на воздухе при комнатной температуре в стерильном контейнере и облучают ультрафиолетом в течение 30 мин. Вырезают и стерилизуют сразу много пробок, так что, если при работе камеру придется открыть, ее следует снова закрыть стерильной пробкой. Все подобные операции следует выполнять в настольном боксе и извлекать пластины из стерильного контейнера только для микроскопического исследования.

В лунке должно быть столько жидкости, чтобы она не вытекала, когда вставляют пробку; вместе с тем после вставления в камере должен оставаться лишь очень

небольшой пузырек воздуха. Выполнить эти требования позволяет пипетка на 0,2 мл. При избытке воздуха на внутренней поверхности пробки во время инкубации конденсируются пары воды в виде мельчайших капелек, которые мешают освещению, когда пластину переворачивают для микроскопического исследования. Кроме того, в перевернутой пластине большой пузырек поднимается кверху, в результате чего изменяется коэффициент преломления среды и искажается изображение.

По своим оптическим качествам такие камеры лучше пробирок, но из-за глубины (6,5 мм) и толщины дна лунок (1,5 мм) они, естественно, уступают камерам Тревана — Робертса, Приора, Круикшенка и Стерилина. Тем не менее, если их правильно заполнять и использовать длиннофокусный конденсор, с ними можно работать при увеличениях порядка 20X.

Сохранение в герметично закрытой камере небольшого объема воздуха предотвращает потерю из среды двуокиси углерода. Количество же кислорода, присутствующего в пузырьке воздуха и растворенного в среде, удовлетворяет потребности клеток, если их не слишком много и если среда меняется не реже одного раза в 3 дня.

Макрофаги, культивируемые в таких камерах, сохраняют сферическую форму и не прикрепляются к дну в течение 12 ч после посева, тогда как в камерах со стеклянным дном при прочих равных условиях они прикрепляются к дну через 2—3 ч. Однако после этого первоначального лаг-периода клетки ведут себя, как обычно, и если среду меняют каждые 3 дня, то они сохраняют жизнеспособность в течение 10 дней; при микроскопическом исследовании в них не удастся выявить каких бы то ни было нарушений. Задержка в прикреплении клеток к дну камеры, вероятно, связана с тем, что поверхность пластика, из которого изготовлены камеры, не смачивается водой.

Камера Уосли особенно ценна для тех случаев, когда в исходном материале мало клеток (как это часто бывает при работе с макрофагами), поскольку небольшая площадь дна камеры (7,5 мм²) и сравнительно большой объем суспензионной среды дают возможность создать

высокую концентрацию клеток на единицу площади. Кроме того, такие камеры позволяют получить сразу много идентичных культур и одновременно исследовать влияние на них различных агентов в разных концентрациях.

СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ

Проблема питательных сред подробно рассмотрена в гл. 1. Однако краткое повторение основных принципов здесь не помешает, поскольку среда представляет собой наиболее важный фактор при культивировании клеток и тканей.

Среда выполняет следующие функции: создает для клеток и поддерживает определенную концентрацию водородных ионов и осмотическое давление, сохраняя клетки от разрушения; обеспечивает клетку различными минеральными солями, аминокислотами, углеводами и витаминами, которые клетки не способны синтезировать сами, но которые необходимы для их длительного выживания; она доставляет клеткам кислород и двуокись углерода.

Естественные и синтетические среды определенного состава

Очевидно, что исследования биохимических и других аспектов жизнедеятельности клетки значительно упростились бы, если бы можно было культивировать клетки на среде строго определенного состава, представляющей собой смесь чистых химических веществ. Такие среды существуют и успешно применяются для культивирования растительных клеток. Однако для роста животных клеток (за исключением одной-двух особых линий клеток, культивируемых на протяжении многих поколений) до сих пор подобных сред не создано. Для культивирования животных клеток нужна либо целиком естественная среда, например плазма, либо синтетическая среда с добавками некоторых естественных компонентов, таких, как сыворотка. Для получения однослойной культуры клеток пригодна только среда с добавка-

ми, поскольку она жидкая; плазма же без обработки высокими дозами антикоагулянтов (что нежелательно) быстро свертывается при соприкосновении со смачиваемой поверхностью сосуда, что мешает нормальному оседанию клеток на поверхности.

Обеспечение кислородом и двуокисью углерода

Большинство нормальных клеток, в том числе макрофаги, нуждается в кислороде. Даже те клетки, которые способны удовлетворять свои энергетические потребности без кислорода (за счет гликолиза), для синтеза различных клеточных компонентов нуждаются в некоторых продуктах цикла Кребса. Большинство клеток в культуре, как и в организме интактного животного, используют для метаболизма углеводов как дыхание, так и гликолиз.

При культивировании клеток в пробирках кислород поступает к ним путем диффузии через среду из воздушного пространства пробирки. В камерах Тревана—Робертса, Приора и Круикшенка—Стерилина объем окружающего газового пространства значительно больше объема среды, и содержание кислорода в таких камерах достаточно для поддержания жизнеспособности клеток в период между сменами среды. В камере Уосли каждая лунка содержит мало клеток, поэтому, как уже отмечалось, в период между сменами среды им хватает растворенного кислорода и кислорода, присутствующего в пузырьке воздуха.

Для оптимального роста и функционирования клеткам разного типа требуются различные количества кислорода. К удобству экспериментаторов при культивировании постэмбриональных макрофагов млекопитающих оптимальная концентрация кислорода в газовой фазе, по-видимому, соответствует его содержанию в атмосферном воздухе.

Присутствие двуокиси углерода в среде для некоторых клеток необходимо и для всех — желательно. Двуокись углерода, выделяемая в процессе дыхания клеток, растворяется в среде с образованием ионов бикарбоната. Эти ионы оказывают сильное буферное действие не

только в среде, но, вероятно, и в клетке. Кроме того, имеются данные об участии двуокиси углерода в цикле Кребса.

Если клетки культивируют в сосудах со свободным газовым пространством, то часть двуокиси углерода уходит в это пространство. Естественно, что чем больше объем газового пространства по отношению к объему среды и числу клеток в культуре, тем больше будут эти потери. Их можно уменьшить, сведя к минимуму объем газового пространства и герметично закрыв камеру, — именно это обеспечивает камера Уосли. Другой способ — поддерживать в атмосфере над средой, в которой культивируются клетки, 5%-ную концентрацию двуокиси углерода. Этого можно достичь очень простым способом — вдувая в камеру время от времени через фильтр выдыхаемый воздух или, что более изысканно, пропускаемая через газовое пространство постоянную струю газа определенного состава (как это делают при работе с камерами типа Тревана—Робертса и Приора).

Применение антибиотиков

Несомненно, что столь широкое развитие метода культуры ткани и клеток оказалось возможным благодаря открытию антибиотиков и тому факту, что некоторые из них при добавлении в питательную среду в бактерицидных концентрациях не влияют на жизнеспособность клеток и тканей. Следует, конечно, помнить, что на раннем этапе работа в этой области (а было сделано немало) проводилась без антибиотиков и тем не менее успешно. Это объясняется тщательной стерилизацией материалов и соблюдением всех правил асептики. И хотя в настоящее время антибиотики входят в состав почти всех питательных сред, нет оснований отказываться от соблюдения обычных асептических мер. В борьбе с бактериальной инфекцией не следует полагаться только на антибиотики, ибо это порождает неряшливость в работе; антибиотики добавляют не для того, чтобы убить в среде микроорганизмы, попавшие туда в результате грязной работы, а для защиты от воз-

можного случайного заражения. Кроме того, нужно иметь в виду, что антибиотики, как следует из самого названия, не абсолютно безвредны для клеток.

Компоненты среды

Среда, наиболее пригодная для культивирования макрофагов человека и животных, должна содержать следующие компоненты.

а) Компоненты определенного химического состава. Это может быть либо среда Игла, либо среда 199. Обе эти среды готовятся на сбалансированном солевом растворе и содержат феноловый красный, как индикатор рН. Стерилизуют их с помощью мембранных фильтров. Среду Игла (основную) и среду 199 лучше получать в виде десятикратных концентратов без бикарбоната и антибиотиков. Такие концентраты можно хранить в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ (от 2 до 10°C) в течение 3 мес. Рабочие растворы получают разведением концентратов стерильной бидистиллированной водой.

б) Естественные компоненты. Для культивирования макрофагов мыши вполне пригодна телячья сыворотка; при культивировании макрофагов человека используют гомологичную сыворотку, макрофагов кролика — аутологичную. Телячью сыворотку можно хранить в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение года. Человеческую сыворотку получают в гематологических отделениях больших клиник.

в) Гепарин. Это вещество в очень низких концентрациях используется для того, чтобы предотвратить слипание клеток. Хранят его в стеклянных ампулах на 5 мл (1000 ед./мл) в обычном холодильнике. Остатки содержимого вскрытой ампулы переносят для хранения в стерильный контейнер.

г) Антибиотики. Для подавления роста грамположительных и грамотрицательных бактерий используют пенициллин и стрептомицин. 1 000 000 ед. пеницилина и 1 000 000 мкг стрептомицина растворяют в 100 мл воды, и такой основной раствор хранят в обычном холодильнике.

д) Раствор бикарбоната натрия. 4,4 г бикарбоната натрия и 1,0 мг фенолового красного растворяют в

100 мл воды и через раствор пропускают двуокись углерода до тех пор, пока он не приобретет янтарный цвет с легким розоватым оттенком. Раствор разливают в маленькие флаконы по 5 мл, закрывают и стерилизуют в автоклаве.

Приготовление рабочей среды

Реактивы смешивают в асептических условиях в следующих пропорциях в указанном порядке:

а) Разбавленная среда определенного состава	90 мл
б) Сыворотка	10 мл
в) Раствор гепарина	1 мл (10 ед./мл)
г) Раствор антибиотиков	1 мл
д) Раствор бикарбоната натрия	Его добавляют по каплям до тех пор, пока желтый цвет смеси не потемнеет до янтарного со слегка розоватым оттенком, что соответствует рН 7,2.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ

Ниже подробно описываются методы получения и культивирования макрофагов из перитонеальной полости мыши и из перитонеального диализата, взятого у человека и из легкого кролика.

МАТЕРИАЛ ИЗ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ МЫШИ

В разделе, посвященном получению макрофагов, уже отмечалось, что данный источник в настоящее время используется наиболее широко. В равной мере пригодны мыши любой линии и обоего пола. Возраст мышей должен быть около 6 нед, так как выход макрофагов в этом случае выше, чем при использовании более молодых или более старых животных. От таких мышей получают достаточно много клеток, поэтому в большинстве случаев нет необходимости прибегать к предварительной внутрибрюшинной инъекции чужеродных веществ.

Принцип метода очень прост. Соблюдая правила асептики, в брюшную полость только что забитых животных вводят среду с небольшим количеством стерильного воздуха; после этого стенку брюшка слегка массируют. При этом жидкость равномерно распределяется по брюшной полости и в нее попадают макрофаги, высвобождающиеся из брюшины. Образующуюся суспензию отсасывают шприцем. Обычно объем получаемой суспензии составляет около 85% объема инъецированной среды. На практике вводят 3,5 мл среды и получают от каждой мыши около 3 мл суспензии. Число мышей определяется объемом суспензии, необходимой для опыта, а объем этот в свою очередь зависит от числа культур и типа сосудов, используемых для культивирования. Для посева в простые пробирки или пробирки Лейтона требуется 1 мл суспензии, в камеру Тревана и Робертса — 0,2 мл, в камеру Приора — 0,25 мл Круикшенка, Купера и Конрана — 0,25 мл, Круикшенка—Стерилина — 0,16 мл, а для каждой лунки камеры Уосли — 0,2 мл.

Суспензии от разных мышей собирают в один стерильный флакон. Флакон нужно держать на холоду, чтобы макрофаги не прикреплялись к стеклу; среду перед инъекцией тоже лучше охладить. Для этого сосуды с клетками и средой держат в чашке с кубиками тающего льда. Работать нужно быстро, так как чем больше времени пройдет после смерти животного, тем меньше будет выход макрофагов. Если требуется много суспензии и приходится забивать по многу мышей, следует это делать не сразу, а партиями по 3—4 животных.

Присутствие воздуха в инъекционной среде (оптимально 1,5 мл) способствует эффективности массажа и, следовательно, высвобождению макрофагов. Кроме того, он увеличивает объем брюшной полости и смещает кишечник, что облегчает отсасывание суспензии.

Метод

1. Подготовка животного. Забитую мышь укладывают на спину, вытянутые конечности фиксируют булавками, живот и боковые поверхности туловища протирают

70%-ным спиртом. Лучше, если все это выполняет помощник. Тем временем экспериментатор тщательно моет руки в проточной воде, лучше асептическим мылом (с гексахлораном), споласкивает их и вытирает стерильным полотенцем.

Животное располагают головой от экспериментатора. Пинцетом с зубчиками захватывают кожу по средней линии живота над лобком, оттягивают ее и образовавшуюся складку разрезают поперек ножницами. Передний край короткого поперечного разреза кожи оттягивают вверх от подлежащей фасции, подводят под кожу ножницы и делают разрез по средней линии брюшка вдоль груди и шеи почти до рта. При разрезании нижнюю браншу ножниц приподнимают, чтобы не повредить подлежащие ткани. Для этой цели удобны ножницы Мэйо с узкими тупыми концами. Большим и указательным пальцами руки захватывают края продольного разреза чуть дальше средней линии и одновременно растягивают их в стороны и чуть вверх, чтобы отделить кожу от подлежащей фасции; при этом обнажаются боковые стенки живота и обе паховые области; лоскуты кожи фиксируют булавками с небольшим натяжением. Таким образом, глубокая фасция боковой и передней брюшной стенок, кроме области средней линии, открывается асептически.

2. Инъекция среды и воздуха. Инъекцию делают через брюшные мышцы в точке несколько выше левой паховой области и левее средней линии. Используют 5-миллилитровый шприц с иглой длиной 16 мм и диаметром 0,45 мм. В шприц набирают 1,5 мл стерильного воздуха из стерилизатора и 3,5 мл охлажденной среды.

Шприц держат так, что игла сначала находится параллельно средней линии тела животного и поверхности доски, на которой оно фиксировано; затем кончик иглы вводят в наружный слой мышц, так чтобы скос иглы был обращен вверх. Не изменяя направления кончика иглы, шприц с иглой поворачивают на 180°, иглу проводят сквозь остальные слои и одновременно слегка нажимают на поршень шприца. Из-за естественной выпуклости брюшка при косом прохождении иглы скос ее практически параллелен пристеночной брюшине. Про-

калывают пристеночную брюшину; этот момент легко распознать, поскольку через тонкую и почти прозрачную мускулатуру хорошо видно, как при вливании жидкости перемещаются близлежащие петли кишечника. Затем медленно вводят все содержимое шприца, двигая иглу вперед примерно на миллиметр. При инъекции брюшко животного постепенно растягивается и становится заметно выпуклым. По извлечении иглы мышцы брюшной стенки сокращаются и закрывают прокол.

3. Массаж. Массаж состоит в легком и быстром постукивании по самой выпуклой части брюшной стенки кончиком указательного или среднего пальца правой руки. Массаж делают не менее 1 мин.

4. Отсасывание суспензии. Пользуются 5-миллилитровым стерильным шприцем с иглой длиной 38 мм и диаметром 0,8 мм. Иглу вводят в точку, находящуюся несколько сзади от наиболее выпуклой части правой половины брюшка. Кончиком иглы прокалывают мышцу и шприц с иглой поворачивают точно так же, как при инъекции среды. Прежде чем ввести иглу в брюшную полость, ею оттягивают боковую стенку живота, чтобы образовался перитонеальный карман, в котором накапливается суспензия (рис. 5.9). В этот карман вводят иглу, отсасывают суспензию (обычно это удается легко) и переносят ее в охлажденный сосуд.

5. Подсчет клеток. Пользуются обычной камерой для счета клеток крови. Камеру заполняют каплей неразбавленной и неокрашенной суспензии и считают все видимые клетки. Обычно получают концентрацию порядка 1 000 000 клеток в 1 мл. Одну треть этих клеток составляют макрофаги, остальные представлены предшественниками макрофагов, лимфоцитами, эозинофилами и тучными клетками. В том случае, если концентрация оказывается выше, суспензию разводят холодной средой.

6. Посев. Посевная доза зависит от типа выбранного сосуда (см. выше). Сосуды с суспензией ставят в термостат (37°C). Через несколько часов большинство клеток оседает на дно сосуда, и если дно сделано из стекла или смачиваемого водой пластика, то макрофаги (и только макрофаги) прикрепляются к нему. Если же

дно сосуда сделано из несмачиваемого материала (камера Крукшенка, Купера и Конрана, микрокамеры Уосли), то макрофаги прикрепляются лишь спустя 10 ч.

Когда макрофаги прикрепятся к дну, исходную среду заменяют свежей, предварительно нагретой до 37°C;



Рис. 5.9. Брюшко мыши, растянутое инъекцированной средой и воздухом.

Перед отсасыванием суспензии иглой оттягивают боковую стенку живота.

при этом другие клетки удаляются из культуры, после чего камеры можно переворачивать для микроскопического исследования.

ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЙ ДИАЛИЗАТ, ВЗЯТЫЙ У ЧЕЛОВЕКА

Перитонеальный диализат является очень хорошим источником человеческих макрофагов; в нем их, как правило, много; других же клеток — эритроцитов, тучных клеток и слущившихся клеток брюшины — мало.

Однако при всех своих достоинствах этот источник макрофагов имеет весьма серьезный недостаток, о котором говорилось выше: диализат бывает заражен возбудителем сывороточного гепатита. Насколько нам известно, этот вирус не оказывает повреждающего воздействия на макрофаги, однако вероятность его присутствия в диализатах обязывает лиц, работающих с ними, строго соблюдать все меры предосторожности против случайного заражения. Возбудитель может попасть в организм через мельчайшие царапины на коже, поэтому работать с диализатами необходимо в резиновых перчатках. Имеются данные о возможности заражения через пищеварительный тракт, поэтому при работе следует надевать плотно пригнанную маску. Это особенно важно во время мытья посуды, поскольку в брызгах, в мельчайших капельках влаги, которыми насыщен окружающий воздух, может присутствовать вирус. Кроме того, перед мытьем посуду следует замачивать на 1,5 ч в растворе детергента.

Собирать диализат должен обязательно кто-либо из персонала клиники. Для этого удобны плоскодонные флаконы на 500 мл с завинчивающимися крышками и резиновыми прокладками. Стерилизуют их сухим жаром и хранят в холодильнике там же, где берут пробы. Диализат собирают в охлажденные флаконы (естественно при строгом соблюдении асептики); быстрое охлаждение снижает потерю макрофагов, уменьшая их способность прикрепляться к стенкам флакона. От одного большого обычно получают 0,5—2 л диализата. Как правило, лечение диализом проводится курсами, и обычно наибольший выход клеток содержится во второй порции диализата. Флаконы с диализатом сразу же доставляют в лабораторию в термосе со льдом или в сумке-холодильнике. Конечно, желательно оповестить об этом заранее, чтобы в лаборатории все было готово.

В лаборатории диализат сначала исследуют невооруженным глазом. Он должен быть соломенного цвета, прозрачным. Если проба слегка мутная, с ней работать можно, если же в ней заметна примесь крови, то от ее использования приходится отказаться. Дальнейшая работа с диализатом состоит из следующих этапов (объ-

емы приведены в расчете на 1 л диализата со средним содержанием макрофагов; при использовании других количеств диализата объемы соответственно изменяют):

1. Диализат центрифугируют (15 мин при 800 об/мин) при температуре не выше $+10^{\circ}\text{C}$. Для этой цели желательно иметь центрифугу с охлаждением, но если пробирки и стаканы предварительно охладить, можно работать и на обычной центрифуге.

2. Надосадочную жидкость выливают, а осадок переносят в чистые центрифужные пробирки, содержащие 100 мл раствора Хэнкса с бикарбонатом.

3. Полученную суспензию центрифугируют (см. п. 1), надосадочную жидкость выливают, а осадок суспендируют в 10 мл культуральной среды, содержащей сыворотку человека (в большинстве случаев пригодна сыворотка, полученная из донорской крови любой группы).

4. Подсчитывают клетки. Рабочая концентрация суспензии должна быть 300 000—500 000 ядросодержащих клеток в 1 мл. Если концентрация в суспензии выше, ее разбавляют, если ниже, ее центрифугируют и осадок клеток суспендируют в меньшем объеме среды.

5. Суспензию клеток переносят в сосуды для культивирования (количество суспензии для разных типов сосудов было указано выше) и инкубируют при температуре 37°C .

6. После того как клетки прикрепятся к стенке сосуда (2—3 ч, если поверхность стеклянная или из смачиваемого пластика, и 10 ч, если поверхность несмачиваемая), среду заменяют свежей теплой средой. При смене среды из культуры удаляется большинство посторонних клеток.

МАТЕРИАЛ ИЗ ЛЕГКОГО КРОЛИКА

У нас нет собственного опыта по использованию этого источника макрофагов, однако, по-видимому, он имеет три весьма существенных достоинства. Во-первых, этот метод получения макрофагов (альвеолярных фагоцитов), предложенный Мирвиком и др. [28], очень прост — клетки вымываются из легких кролика физиологическим раствором через трахею. Во-вторых, он обес-

печивает высокий выход макрофагов — в среднем около 12 000 000 клеток из легких одного животного. В-третьих, из других клеток вместе с макрофагами вымываются только полиморфноядерные лейкоциты, причем их примерно в 100 раз меньше, чем макрофагов, и они погибают в культуре через 1—2 дня; очень редко встречаются лимфоциты, которые тоже, как правило, быстро погибают. Этим достоинствам противостоят три недостатка, из которых два незначительны, а третий делает такие макрофаги не пригодными для некоторых целей. Во-первых, даже у здоровых животных в трахее и крупных бронхах, как правило, присутствуют бактерии, поэтому в культуральную среду всегда приходится добавлять антибиотики. Во-вторых, поскольку сыворотка некоторых кроликов токсична для клеток других животных, в том числе и кроличьих, то лучше в качестве естественного компонента среды использовать не гомологичную, а аутологичную сыворотку, что несколько усложняет методику. Наконец, в-третьих, альвеолярные фагоциты, по крайней мере кроличьи, содержат значительные количества лизоцима, которого нет в перитонеальных макрофагах и, возможно, в макрофагах, полученных из других источников. Эту особенность нужно по крайней мере иметь в виду при экспериментальном исследовании действия таких альвеолярных макрофагов на бактерии.

Методика Мирвика и др. [28] сводится к следующему:

1. Используют здоровых кроликов весом 1,8—2,2 кг (авторы работали на белых новозеландских кроликах, но можно, конечно, использовать и другие породы). Животных забивают быстрой инъекцией 40 мл воздуха в краевую ушную вену.

2. Вскрывают грудную полость, передний конец трахеи выделяют из окружающих тканей, зажимают, чтобы в нее не поступала кровь, и отрезают впереди зажима. Задний отдел трахеи с зажимом, легкие и сердце извлекают целиком. Осторожно отрезают сердце, следя за тем, чтобы не повредить легкие и бронхи.

3. Препарат отмывают от крови теплым физиологическим раствором, осторожно промокают марлевым там-

поном, на стенку трахеи накладывают второй зажим так, чтобы не порвать ее и не закупорить просвет, и с помощью этого зажима препарат подвешивают.

4. С трахеи снимают зажим и заливают в нее раствор Хэнкса до тех пор, пока легкие не расправятся. Обычно для этого достаточно 30—40 мл раствора; заливать лучше непосредственно в главные бронхи, сначала в один, потом в другой, так как при этом происходит равномерное растяжение всех долей легкого. Затем трахею снова пережимают, легкие осторожно массируют, снимают зажим и жидкость выливают в сосуд. Этот процесс повторяют еще раз.

5. Оба смыва сливают и центрифугируют (20 мин при 1500 об/мин). Если между прозрачной надосадочной жидкостью и осадком клеток окажется мутный слой, состоящий из слизи и фрагментов клеток, его осторожно удаляют пастеровской пипеткой; остальную надосадочную жидкость выливают или отсасывают, а осадок суспендируют в культуральной среде, содержащей 25% аутологичной сыворотки. Суспензию переносят в сосуды для культивирования и инкубируют при 37 °C.

Хотя, как уже упоминалось, мы не пользовались этим источником макрофагов и поэтому у нас нет собственного опыта работы с ним, тем не менее некоторые наши замечания могут оказаться полезными.

Для того чтобы избежать бактериального загрязнения, на всех этапах следует строго соблюдать правила асептики, вплоть до использования стерильного воздуха для забивки животных.

Прежде чем вливать в легкие раствор, его лучше подогреть до 37 °C, поскольку холодное вливание может вызвать сокращение мускулатуры бронхов. Сосуд, в который выливают смыв, должен быть, наоборот, охлажден, для того чтобы макрофаги не прикреплялись к его стенкам. Центрифугировать смывы нужно на холоду: либо в центрифуге с охлаждением, либо в обычной центрифуге, но с предварительно охлажденными стаканами и пробирками.

Довольно высокая скорость и продолжительное время центрифугирования, указанные в п. 5, используются при стандартной методике, при которой выход клеток

определяется по объему осадка. Если же подсчет клеток в пробе производить так же, как при работе с перитонеальными макрофагами, то скорость центрифугирования можно снизить, что позволит уменьшить механическое повреждение клеток.

Если предположить, что среднее число клеток, получаемое от одного животного, равно 12 000 000, из которых 99% составляют макрофаги, то для получения суспензии с концентрацией 300 000—500 000 клеток в 1 мл требуемый объем среды составляет около 30 мл, т. е. из такой суспензии можно получить большое число культур.

Для получения аутологичной сыворотки можно взять 50 мл крови из краевой ушной вены непосредственно перед введением в нее воздуха при забивке животного. Из этого количества крови получают около 30 мл сыворотки — количество, достаточное для посева клеток и последующей смены среды. После прикрепления макрофагов к стенке сосуда для культивирования исходную среду меняют на свежую теплую среду и таким образом удаляют из культуры не прикрепившиеся посторонние клетки.

Вероятно, не безынтересно упомянуть, что Хейс и др. [37] успешно применили этот метод получения макрофагов из легких морской свинки.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Metschnikoff E.* (1833, 1884) cited by *Cameron R.*, in *Pathology of the Cell*, Oliver and Boyd, Edinburgh, 196 (1952).
2. *Aschoff L., Kiyono K.* (1913) cited by *Cameron R.*, in *Pathology of the Cell*, Oliver and Boyd, Edinburgh, 205 (1952).
3. *Ranvier I.* (1899) cited by *Jacoby F.*, in *Cells and Tissues in Culture*, Academic Press, London, 2, 27 (1965).
4. *Del Rio Hortega P.*, *Penfield's Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, Hoeber, New York, 2, section 10, 481 (1932).
5. *Kupffer C. Von* (1898) cited by *Cameron P.*, in *Pathology of the Cell*, Oliver and Boyd, Edinburgh, 205 (1952).
6. *Aschoff L.*, *Lectures on Pathology*, Hoeber, New York, chapter 1 (1924).
7. *Cappell D. F.*, *J. Path., Bact.*, 32, 595 (1929).
8. *Cappell D. F.*, *J. Path. Bact.*, 33, 429 (1930).
9. *Downey H.* (Ed.) *Handbook of Hematology*, Hoeber, New York, 1 (1938).

10. *Jacoby F.*, in *Cells and Tissues in Culture*. Ed. *Willmer E. N.*, Academic Press, London, 2, chapter 1 (1965).
11. *Nelson D. S.*, *Macrophages and Immunity*. Vol. 11 of *Frontiers of Biology*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1969.
12. *Del Rio Hortega P.*, *De Asúa F. J.* (1921) cited by *Marshall A. H. E.*, *J. Path. Bact.*, 58, 729 (1946).
13. *Well A.*, *Davenport H. A.*, *Archs Neurol. Psychiat.*, Lond., 30, 175 (1933).
14. *Marshall A. H. E.*, *J. Path. Bact.*, 58, 729 (1946).
15. *Carrel A.*, *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 94, 1345 (1926).
16. *Toner P. G.*, *Carr K. E.*, *Cell Structure*, Livingstone, Edinburgh, 48 (1968).
17. *Carrel A.*, *Ebeling A. H.*, *J. exp. Med.*, 36, 365 (1922).
18. *Mallucci L.*, *Virology*, 25, 30 (1965).
19. *Franzl R. E.*, Personal Communication to *Gesner B. M.*, *Howard J. G.*, in *Handbook of Experimental Immunology* edited by *Weir D. M.*, Blackwell, Oxford, 1022 (1967).
20. *Argyris B. F.*, *J. Immun.*, 99, 744 (1967).
21. *Suter E.*, *J. exp. Med.*, 96, 589 (1956).
22. *Hirsch J. G.*, *J. exp. Med.*, 103, 589 (1956).
23. *Fishman M.*, *J. exp. Med.*, 114, 837 (1961).
24. *Cohn Z. A.*, *Wiener E.*, *J. exp. Med.*, 118, 991 (1963).
25. *Lucke B.*, *Strumia M.*, *Mudd S.*, *McCuicheon M.*, *Mudd E. B. H.*, *J. Immun.*, 24, 455 (1933).
26. *Volkman A.*, *J. exp. Med.*, 124, 241 (1966).
27. *Bishop D. C.*, *Pisciotta A. V.*, *Abramoff P.*, *J. Immun.*, 99, 751 (1967).
28. *Myrvik Q. N.*, *Leake E. S.*, *Fariss B.*, *J. Immun.*, 86, 128 (1961).
29. *Roberts D. C.*, *Trevan D. J.*, *Jl R. microsc. Soc.*, 79, 361 (1961).
30. *Cruikshank C. N. D.*, *Cooper J. R.*, *Conran M. B.*, *Expl Cell Res.*, 16, 695 (1959).
31. *Takatsy G.* (1950) cited by *Sever J. L.*, *J. Immun.*, 88, 320 (1962).
32. *Takatsy G.*, *Furesz J.*, *Farkas E.*, (1954) cited by *Sullivan E. J.*, *Rosenbaum M. J.*, *Am. J. Epidem.*, 85, 424 (1967).
33. *Sever J. L.*, *J. Immun.*, 88, 320 (1962).
34. *Sullivan E. J.*, *Rosenbaum M. J.*, *Am. J. Epidem.*, 85, 424 (1967).
35. *Wasley G. D.*, *J. med. Lab. Technol.*, 26, 134 (1969).
36. *Myrvik Q. N.*, *Leake E. S.*, *Fariss B.*, *J. Immun.*, 86, 133 (1961).
37. *Heise E. R.*, *Han S.*, *Weiser R. S.*, *J. Immun.*, 101, 1004 (1968).

ХРАНЕНИЕ КЛЕТОК ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Д. МЭЙ

The Lord Rank Research Centre, High Wycombe, Bucks

ВВЕДЕНИЕ

Опубликованное в 1776 г. сообщение Спалланцани было одним из самых первых, посвященных использованию холода при наблюдении за клетками. Наблюдая с помощью микроскопа сперматозоиды жеребца, предварительно охлажденные снегом, он обнаружил интересные явления, которые записал следующим образом:

«Снег оказывал то же действие, что и зимний холод, т. е. через 14 мин сперматозоиды становились неподвижными; в тепле же они сохраняли способность к движению в течение 7,5 ч. Но случай, который произошел в этом опыте, заставил меня задуматься и отрешиться от некоторых предубеждений. Увидев, что вермикули стали неподвижными, я вынул пробирку из снега и поставил ее в тепло. Спустя час случайно взглянув в микроскоп, я был поражен, обнаружив, что вермикули ожили и выглядели так, как будто их только что получили из семенных протоков. Итак, холод не убил, а лишь полностью обездвижил их. Я снова поместил пробирку в снег и через $\frac{3}{4}$ ч взял обратно. Вот, что мне удалось увидеть:

Через несколько минут их оживленность стала ослабевать, и это продолжалось до тех пор, пока они полностью не потеряли способность передвигаться, сохранив лишь колебательные движения, которые закончились еще через несколько минут. Прямо противоположная картина наблюдалась, когда их переносили из снега в тепло. Сначала они начинали совершать колебательные движения, потом тело, а затем и хвост начинали

вибрировать в продольном направлении справа налево; это движение передавалось всему вермикуллю, и вскоре они вновь активно двигались».

В своих экспериментах Спалланцани не применял никаких веществ, которые снижали бы подвижность клеток и таким образом облегчали бы наблюдение за ними в технически несовершенный микроскоп, доступный ему в то время.

Примерно через сто лет вновь были повторены эксперименты со спермой, подвергнутой воздействию низких температур (Prevost, 1840; de Quatrephages, 1853; Mantegazza, 1866 и Scheuk, 1870).

Мантегацца [2] проводил исследования, связанные с сохранением спермы человека. Толчком к таким исследованиям послужили его наблюдения, свидетельствовавшие о некоторой устойчивости этих клеток к замораживанию и оттаиванию. В то время Мантегацца пытался найти практическое применение обнаруженному им свойству сперматозоидов, разрабатывая метод, который сейчас известен как искусственное осеменение.

В 1900 г. было показано, что многие биологические объекты, например семена, бактерии и некоторые сложные биохимические соединения, выдерживают хранение при низких температурах в жидком воздухе. На основе этих наблюдений позднее были разработаны методы хранения пищевых продуктов в таких условиях. Результаты этого направления исследований хорошо известны теперь каждому из нас.

В 1940 г. Шеттлс [3] обнаружил, что сперматозоиды человека устойчивы к внезапным изменениям температуры. Неразбавленную семенную жидкость человека, которая содержалась в запаянных микропробирках, он подвергал воздействию низких температур (от -79 до -196°C); примерно 10% клеток сохраняли жизнеспособность после такой обработки.

С 40-х годов исследования по хранению биологических объектов при низких температурах расширились. В 1945 г. Паркес [4] показал, что количество клеток, выдержавших хранение, увеличивается, если замораживать большие объемы пробы. Однако более подробное изучение спермы стало возможным после того, как было

установлено, что в определенных условиях хранения при низких температурах глицерин способствует выживанию клеток.

Полное представление о состоянии этого вопроса в то время дает обзор Шермана [5], а к числу наиболее крупных успехов того времени следует отнести работу Полже и др. [6], выполненную в 1949 г. Используя опять-таки сперматозоиды, авторы отмеченной работы показали, что добавление глицерина к суспензии клеток значительно увеличивает их выживаемость при -79°C .

Наши знания по этому вопросу значительно пополнились после работы Луйе [7], ставшей теперь классической. За ней последовала работа Лавлока [8], который также показал, что главной причиной повреждения клеток во время замораживания является повышение концентрации электролитов и что доля поврежденных клеток особенно высока, если увеличение концентрации происходит в клетке или около нее.

Теоретические основы замораживания клеток изложены в работе Мерримэна [9], в которой он подробно описал процессы при замораживании, а также в его более поздних работах [10] и в публикациях Рэя [11, 12].

Хранение клеток при пониженной температуре очень широко применяется в вирусологии, и поэтому многие публикации были связаны с этой областью исследования. Некоторые важные успехи в вирусологии были сделаны в результате совместного использования методов культивирования клеток и тканей и хранения клеток при низких температурах. Дальнейшим вкладом в эту область послужила работа Смита [13] в 1961 г.

Период между 1949 и 1960 гг. можно назвать «глицериновым» периодом, поскольку в это время в качестве консервирующего агента использовался почти исключительно глицерин. Однако к концу этого периода в центре внимания оказалось соединение, имеющее совершенно иную химическую структуру, а именно диметилсульфоксид (ДМСО).

В настоящее время нельзя утверждать, что как консервирующий агент ДМСО предпочтительнее глицерина. Результаты опытов по длительному хранению, вероятно, покажут, что для хранения одних клеток лучше

использовать глицерин, а для хранения других — ДМСО. Теоретические основы применения диметилсульфоксида описаны в работе Фарранта [14]. Дальнейшая работа по использованию в качестве консервирующих агентов не глицерина, а других веществ была проделана Нэшем [15] и опубликована в 1966 г.

Определенные успехи были достигнуты и в разработке довольно сложного прибора для замораживания клеток с определенной скоростью, в результате чего увеличилась выживаемость клеток при хранении. Такой прибор, выпускаемый в настоящее время, отличается очень высоким качеством и им пользуются во многих лабораториях.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

До сих пор не существует удовлетворительной теории, которая могла бы полностью объяснить механизмы консервации клеток. Разнообразные методы замораживания и оттаивания клеток имеют свои проблемы.

Информация, полученная при комплексных исследованиях структуры, функции и химического состава клеток, позволила лишь частично понять происходящие процессы и не дала возможности построить стройной теории. В ряде работ, опубликованных общепризнанными авторитетными специалистами в области криобиологии, даются блестящие обзоры многих спорных аспектов этой проблемы. К числу наиболее важных работ следует отнести работы Луйе и Гехенио [16], а также Смита [17] и Вуда [18]. Были разработаны разные методики для получения экспериментальных данных [19, 20].

В обзоре Трампа и др. [21] содержатся данные о влиянии замораживания и оттаивания на цитоплазматические структуры животных и растительных клеток. По данным электронной микроскопии при замораживании и оттаивании в клетках происходят значительные изменения, причем каждый метод дает свой спектр изменений. Результаты их работы подтверждали, что очень медленное замораживание и очень быстрое оттаивание вызывают наименьшее повреждение клеток.

Когда жизнеспособные клетки и ткани замораживают в поддерживающей среде, в них наблюдаются резкие изменения. Вопросы, связанные с этими изменениями, хорошо изложены и освещены в работе Мерримэна [22]. Современные приборы, которые используются в криобиологии, значительно облегчили проводимые сейчас исследования.

При температуре ниже 0°C в клетках начинается образование кристаллов льда. Кристаллы состоят в основном из воды и растут по мере понижения температуры.

Концентрация в клетке таких соединений, как электролиты, медленно увеличивается в оставшейся воде. По-видимому, кристаллы льда в клетке не образуются, если температуру понижают постепенно [23]. Лавлок [24] показал, что наиболее сильные повреждения клеток во время замораживания вызывают высокие концентрации веществ, оставшихся в небольшом количестве незамерзшей воды. Позднее было обнаружено [25], что резкие изменения, которые вызывают электролиты, происходят при температурах от -5 до -10°C . При температуре ниже -10°C повреждения менее значительны.

Для того чтобы свести к минимуму эти повреждения, скорость охлаждения клеток от 0 до -20°C должна быть небольшой. При таких условиях образование кристаллов льда происходит вне клетки и обезвоживание ее не повреждает. Оптимальной скоростью падения температуры от 0 до -20°C считается приблизительно 1°C в минуту. Верхние пределы температуры для хранения клеток не определены, а нижний предел должен быть ниже -130°C . При температуре, ниже указанной, химическая и физическая активность минимальны.

Многие охлаждающие жидкости имеют температуру, достаточную для замораживания клеток. Наиболее широко используется жидкий азот, имеющий точку кипения при -196°C . При такой температуре не происходит ни химических, ни физических изменений.

Жидкий азот имеет ряд преимуществ по сравнению с другими охлаждающими агентами. Он недорогой, легко доступен, не влияет на pH пробы и не оставляет следов при испарении.

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Когда клетки консервируют при минусовых температурах, необходимо создать такие условия, в которых они способны выжить и которые вызывали бы минимальные структурные повреждения. Судить о влиянии низких температур трудно, потому что клетки, явно поврежденные (о чем свидетельствует их деформация) часто сохраняют жизнеспособность, а клетки, которые выглядят хорошо, могут оказаться нежизнеспособными.

По отношению к клеткам нельзя применять критерии, которые применяют при оценке сохранности какого-либо другого биологического материала. При охлаждении клеток ниже 0°C наблюдаются, как указывалось выше, следующие основные изменения: 1) образуются кристаллы льда; 2) исчезает вода; 3) увеличивается концентрация растворимых веществ в клетке. Эти изменения часто происходят одновременно.

Быстрое охлаждение может вызвать температурный шок, в результате которого клетки сильно повреждаются и гибнут. Лавлок [26] предполагает, что этот эффект обусловлен повреждением клеточных мембран, хотя истинная причина пока не ясна. Кроме того, одни клетки, по-видимому, более чувствительны к таким повреждениям, чем другие [27]. Индивидуальность клеток особенно проявляется при образовании кристаллов льда.

Если клетки охлаждают достаточно медленно, то они обезвоживаются, но не замерзают. При более быстром охлаждении, однако, клетки меньше обезвоживаются, но происходит замораживание внутри клетки. Увеличение скорости охлаждения приводит к образованию небольших кристаллов льда внутри клеток. Быстрое оттаивание необходимо для того, чтобы помешать превращению этих мелких кристаллов в крупные. Такой процесс, называемый рекристаллизацией [28—30], произойдет, если оттаивание осуществлять медленно. Более подробные сведения об изменениях, связанных с образованием льда в клетках при замораживании, можно найти в работе Мерримэна [31]. Мазур [32] дает возможное объяснение связи между размерами кристаллов льда и степенью повреждения клеток.

МЕТОДЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ

Имеется много опубликованных работ, посвященных именно этим аспектам хранения клеток при низких температурах. Некоторые точки зрения на эти вопросы противоречивы, тем не менее можно вывести некоторые общие правила, касающиеся техники замораживания живых клеток.

ЗАМОРАЖИВАНИЕ

Замораживание должно быть медленным, пока температура не снизится по крайней мере до -20°C . Оптимальная скорость снижения температуры приблизительно 1°C в минуту. Снижение температуры от -20°C до температуры хранения (в жидком азоте эта температура составляет -196°C) должно быть по возможности очень быстрым. Не следует замораживать большое количество клеток, чтобы теплообмен в пробе был быстрым и равномерным.

Среда, в которой суспендируют клетки, состоит из ростовой среды, но с более высоким, чем обычно, содержанием сыворотки, а также с добавлением либо глицерина, либо диметилсульфоксида. Для хранения клеток необходимо использовать проверенные и надежные аппараты. Колебания температуры в аппарате могут сильно повредить клетки. Такое осложнение возникает при работе с аппаратами устаревших моделей, в которых клетки охлаждают твердой двуокисью углерода. Использование жидкого азота позволяет избежать колебаний температуры.

Метод

Снижение температуры можно контролировать разными способами. Примером простого «самодельного» прибора, основанного на использовании охлаждающего действия испаряющегося жидкого азота, может служить прибор, предложенный Нагинтоном и Гривесом [33]. По тем же принципам действует технически более совершенный прибор, выпускаемый фирмой Union Carbide. Оба прибора требуют калибровки, но при умелом обращении они дают удовлетворительные результаты.

Помимо таких простых приборов, существуют также сложные электронные приборы. Один из них, впервые описанный Пеггом и др. [34], был применен для хранения замороженных клеток костного мозга. В дальнейшем выяснилось, что такие приборы можно использовать для разных клеток и другого биологического материала, особенно если требуется точно запрограммированная скорость понижения температуры.

Для хранения берут молодые культуры. Если клетки культивировали в монослое, то их снимают с поверхности стекла трипсином, промывают и суспендируют в среде для замораживания. Суспензию клеток определенной концентрации запаивают в ампулы. Подробно этот метод описан в работе Уосли и Мэя [35].

ОТТАИВАНИЕ

Этот процесс должен быть по возможности быстрым. Ампулы, взятые из жидкого азота, сразу же помещают в водяную баню при 40°C . Как только клеточная суспензия полностью оттает, ее разводят предварительно подогретой ростовой средой. Оттаивание лучше всего проводить в закрытой бане. Ею может служить стакан из нержавеющей стали, покрытый металлической сеткой.

ХРАНЕНИЕ В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ

Некоторые исследователи считают, что при использовании рефрижераторов с жидким азотом последний может представлять собой опасность. При попадании на кожу он вызывает повреждение ткани. Кроме того, плохо запаянные ампулы при оттаивании могут взорваться. Поскольку сосуд, в котором находится жидкий азот, имеет довольно узкое горло, все операции, связанные с помещением и извлечением ампул, затруднены. По этим и другим причинам в настоящее время клетки предпочитают хранить в газовой фазе над жидким азотом. В таких условиях, до тех пор пока присутствует охлаждающее вещество, сохраняется постоянная температура -130°C , но, как правило, она еще ниже. Имеются сосуды, специально приспособленные для хранения клеток

в парах азота. Брансон и Мак-Гиннис [36] разработали метод хранения эритроцитов в парах жидкого азота, предложив помещать ампулы с клетками на сетки, изготовленные из нержавеющей стали. Перенос материала при пониженной температуре осуществляют в специальных сосудах, содержащих пары азота.

ФИРМЫ, ПОСТАВЛЯЮЩИЕ ПРИБОРЫ

Cryogenic Equipment Sales Division
Union Carbide Ltd., London, W.1.

B.O.C. Cryoproducts Ltd., British Oxygen Company, London, S.W.19

Messers. Yohnson and Jorgenson Ltd., Heringham Road, London, don, S.E.7

Messers. Scientific Supplies Ltd., Scientific House, Vine Hill, London, E.C.1.

Messers. Arnold Veterinary Ltd., Cremyll Road, Richfield Estate, Reading, Berks.

Messers. Sterilin Ltd., Richmond, Surrey

Messers. Baird and Tatlock, The Matburn Agents

Spemby Technical Products, Trinity Trading Estate, Sittingbourne, Kent.

Chandos Products (Scientific), New Mills, Stockport, Cheshire

Сосуды для хранения в жидком азоте
Сосуды для переноса материала в жидком азоте
Контейнеры для хранения в жидком азоте
Приборы для охлаждения с контролируемой скоростью

Вивостаты — сосуды для хранения в жидком азоте
Сосуды для переноса в жидком азоте
Приборы для измерения уровня жидкого азота
Переносные насосы
Тележки для газовых контейнеров

Ампулы из стекла с низким коэффициентом расширения, специально предназначенные для низких температур
Защитные маски для лица

Асбестовые перчатки

Штативы для ампул при хранении в жидком азоте

Пластиковые контейнеры для хранения в жидком азоте

Приборы для программированного охлаждения

Самое разнообразное оборудование для хранения, переноса и т. д. в жидком азоте

Холодильные шкафы с температурой от -50 до -80°C

РЕАКТИВЫ

British Drug Houses (Chemical Division), Poole, Dorset

Messers. Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, Kent

Tissue Culture Services, Slough, Bucks

The British Oxygen Company, London, S.W.19

Глицерин (A.R)
Диметилсульфоксид

Среда для культивирования клеток, концентраты, порошки
Телячья сыворотка

Телячья сыворотка и сыворотка эмбриона коровы

Жидкий азот

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Spallanzi* (1776) cited by *Mann T.*, in "The Biochemistry of Semen", Methuen, London, 1954.
2. *Mantegazza R. C.*, Ist Lombardo, 3, 183 (1866).
3. *Shettles L. B.*, Am. J. Physiol., 128, 408 (1940).
4. *Parkes A. S.*, Br. med. J., 2, 212 (1945).
5. *Sherman J. K.*, Fert. Steril., 15, 485 (1964).
6. *Polge C., Smith A. U., Parkes A. S.*, Nature, Lond., 164, 665 (1949).
7. *Luyet B. J.*, Freezing/Drying Symposium, p. 77, Ed. *Harris R. J. C.*, Institute of Biology.
8. *Lovelock J. E.*, Biochim. biophys. Acta, 11, 28 (1953).
9. *Merryman H. T.*, Science N. Y., 124, 515 (1956).
10. *Merryman H. T.*, Proc. R. Soc., 147, 452 (1957).
11. *Rey L. R.*, Annls Nutr. Aliment., 11, 103 (1957).
12. *Rey L. R.*, Proc. R. Soc., 147, 460 (1957).
13. *Smith A. U.*, The Biological Effects of Freezing and Supercooling, Edward Arnold, London, 1961.
14. *Farrant J.*, Lab. Pract., 15(4), 402 and 409 (1966).
15. *Nash T.*, Cryobiology, Ch. 5. Ed. *Merryman H. T.*, Academic Press, London, 1966.
16. *Luyet B., Gehenio P. M.*, "Life and Death at Low Temperatures", Biodynamica, 1949.
17. *Smith A. U.*, The Biological Effects of Freezing and Supercooling, Edward Arnold, London, 1961.
18. *Wood T. H.*, Adv. biol. med. Phys., 4, 119 (1956).
19. *Trump B. F., Goldblatt P. J., Griffin V. S.*, Lab. Invest., 13, 967 (1964).
20. *Waravdekar V. S., Goldblatt P. J., Trump B. F.*, J. Histochem. Cytochem., 12, 498 (1964).
21. *Trump B. F., Yuong D. E., Arnold E., Stowell R.*, Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol., 24, Part III, No. 2 (1965).
22. *Merryman H. T.*, Science N. Y., 124, 515 (1956).
23. *Tokio N.*, Recent Research in Freezing and Drying, Blackwell, Oxford, 1960.
24. *Lovelock J. E.*, Biochim. biophys. Acta, 10, 414 (1953).
25. *Merryman H. T.*, Recent Research in Freezing and Drying, Blackwell, Oxford, 1960.

26. Lovelock J. E., Nature, Lond., 173, 659 (1954).
27. Sherman J. K., Fert. Steril., 14, 49 (1963).
28. Menz L. J., Luyet B. J., Biodynamica, 8, 261 (1961).
29. Rapatz G., Luyet B. J., Biodynamica, 8, 295 (1961).
30. Rey L. R., Proc. R. Soc., 147, 460 (1957).
31. Merryman H. T. (Ed.), Low Temperature Research in Biology, Academic Press, London, 1966.
32. Mazur P., in Low Temperature Research in Biology, Ed. Merryman H. T., Academic Press, London, 1966.
33. Nagginton J., Greaves R. I. N., Nature, Lond., 194, 4832 (1962).
34. Pegg A., Trotman C. E., J. clin. Path., 12, 477 (1959).
35. Wasley G., May J. W., Animal Cell Culture Methods, Blackwell, Oxford, 1970.
36. Branson W. R., McGinnis M. H., Blood, 20, 478 (1962).

Глава 7

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОМОСОМ

Дж. ХАЙМЭН и А. ПОЛДИНГ

Department of Pathology, Southmead Hospital, Bristol

ВВЕДЕНИЕ

Анализ кариотипа клеток кроветворной и соединительной ткани человека представляет собой весьма важную диагностическую процедуру при полном цитогенетическом исследовании больных, у которых по клиническим данным предполагаются хромосомные аномалии. В отличие от относительно простого способа получения 2—3-дневных культур лимфоцитов крови (наиболее широко используемый источник клеток для хромосомных исследований) культивирование фибробластов — более сложная процедура, включающая длительный период (несколько недель), в течение которого получают соответствующую клеточную популяцию, достаточную для проведения исследования. Длительное культивирование, трудности, связанные с ростом клеток в культуре, варьирующим у разных больных, — все это ограничивает применение метода культивирования фибробластов в целях диагностики.

Методы получения достаточного количества метафазных клеток человека делят на 3 группы (в зависимости от типа исследуемых клеток). К первой относятся методы, не требующие больших затрат времени, — это кратковременное культивирование костного мозга из грудины или гребня подвздошной кости; препараты из этого материала можно приготовить менее чем через 24 ч, не применяя агенты, вызывающие митозы [1, 2]. Ко второй группе относятся методы, связанные с пролиферацией бластоподобных клеток из зрелых лимфоцитов крови, селезенки, лимфатических узлов и т. д. В этом случае для стимуляции митозов добавляют фи-

тогемагглютинин [3]; опыт длится 48—72 ч. И наконец, третья группа методов связана с длительным культивированием фибробластов из плотных тканей, таких, как кожа, без применения агентов, индуцирующих митоз. Методы выращивания фибробластов или фибробластоподобных клеток в свою очередь подразделяются на 2 группы в зависимости от способа инициации первичной культуры: либо из клеточной суспензии, получаемой механически или трипсинизацией исходного материала [4], либо из кусочка ткани, предварительно заключенного в сгусток [5]. Ниже приведен метод получения метафазных пластинок из соединительной ткани человека; этим методом, основанным главным образом на ранее описанных методах [6, 7] с некоторыми модификациями, пользуются в лаборатории авторов.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРИИ И АППАРАТУРЕ

Как в любом случае длительного культивирования, успешное поддержание культуры фибробластов пересекается в течение нескольких недель или больше зависит от соблюдения правил асептики, что предотвращает попадание микроорганизмов в культуры. Работу с фибробластами можно проводить в помещении, используемом для других лабораторных работ, но при этом повышается вероятность заражения культур. Антибиотики, которые добавляют в основную ростовую среду, лишь частично обеспечивают защиту от случайно попадающих микроорганизмов. Для успешной работы с культурами фибробластов основным требованием является наличие отдельного помещения, стены которого и рабочая поверхность стола должны легко мыться. Необходим также простой бактериологический колпак. Важно помнить, что большая часть материала, получаемого для хромосомного анализа, невосполнима, поскольку не всегда возможно провести повторную операцию у больного. По этой причине для проведения предполагаемых цитогенетических исследований на фибробластах необходимо обеспечить отдельное удобное помещение.

Из лабораторного оборудования, которое требуется для культивирования фибробластов, необходимы термо-

стат, водяная баня, инкубатор, холодильник, 2 специальных газовых баллона, инвертированный микроскоп и центрифуги.

Термостат

Весьма важно, чтобы в выбранном термостате поддерживалась постоянная температура, равная $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, и чтобы эта температура сохранялась по всему объему термостата. Термостат LEEC Precision Incubator, выпускаемый фирмой Laboratory and Electrical Engineering Company (Colwick, Estates, Nottingham), обеспечивает стабильную температуру с минимальными отклонениями и имеет автоматическое отключение в случае перегрева.

Водяная баня

Для нагревания среды и размораживания реактивов удобна стандартная водяная баня с внутренними размерами $13 \times 10 \times 6$ см, в которой поддерживается постоянная температура.

Инкубатор

Эмбриональный экстракт получают из 10-дневных куриных эмбрионов, поэтому необходим небольшой инкубатор или брудер. Относительно недорог и прост в обращении Curfew electric observation incubator (Curfew Appliances Ltd., Ottershaw, Chertsey Surrey), в котором может одновременно помещаться 60 яиц. Уход за инкубатором сводится в основном к поддержанию нужной влажности, для чего следует лишь регулярно подливать воду в подносы.

Холодильник

Для хранения сред, реактивов и тканей может служить небольшой бытовой холодильник, имеющий камеру для замораживания.

Специальные газовые баллоны

При культивировании клеток 5%-ное содержание CO_2 в воздухе поддерживается с помощью калиброванного баллона с вентилем, обеспечивающим строго контролируемую подачу. Газ поступает преимущественно

под бактериологический колпак на рабочем столе. Запасной баллон служит для заполнения основного баллона.

Инvertированный микроскоп

Для периодической проверки роста клеток в сосудах пользуются инvertированным микроскопом, который позволяет исследовать клеточный слой снизу, не переворачивая его. Сосуд с культурой помещают на подвижный столик, расположенный над револьверной головкой микроскопа с объективами; источник света и конденсор находятся над сосудом. Prior Mark II Inverted Microscope (W. R. Prior and Co. Ltd., Bishop's Stortford, Herts) позволяет исследовать клетки, растущие в различных сосудах: от узких флаконов Карреля до матрасов глубиной 77 мм.

Центрифуги

Два типа центрифуг, имеющих крестовину на 6 стаканов по 20 мл и на 4 стакана по 60 мл, вполне удовлетворят потребности лаборатории.

ПОДГОТОВКА СТЕКЛЯННОЙ ПОСУДЫ

Вся стеклянная посуда, применяемая при культивировании фибробластов, требует специальной обработки, поэтому ее следует мыть отдельно от другой лабораторной посуды, особенно если возможно загрязнение силиконизирующими жидкостями или сильными детергентами. Жиры и токсические вещества на поверхности стекла препятствуют прикреплению фибробластов для образования монослоя. Плохо вымытая посуда — одна из основных причин слабой пролиферации фибробластов в первичной культуре или в последующих пересевах; поэтому крайне важно тщательно следить за чистотой сосудов, в которых выращивают фибробласты.

Необходимая стеклянная посуда

Флаконы Карреля, 45×10 мм.

Гексагональные «рожки» из Пирекса объемом 125 мл.

Плоские матрасы объемом 100 мл.
Универсальные узкогорлые контейнеры.
Маленькие бутылочки.
Конические центрифужные пробирки.
Чашки Петри диаметром 6 см.
Пастеровские пипетки.
Градированные пипетки.

Мытье посуды

Растворы

Концентрированный раствор метасиликата натрия (360+40 г кальгона, растворенных в 4 л воды)
1 н. HCl.
Стандартный Stergene (детергент).

Метод

Новую и использованную стеклянную посуду замачивают на ночь в растворе метасиликата натрия, разбавленном в 100 раз водой, промывают водопроводной водой и нейтрализуют 1 ч в 0,01 н. HCl. Обработанную посуду погружают в горячий детергент — 10 мл Stergene в 5 л горячей водопроводной воды. На этой стадии внутреннюю поверхность сосудов очищают ершиком, а пипетки промывают горячим раствором детергента, пропуская детергент через пипетку несколько раз. Споласкивают 3 раза проточной горячей водопроводной водой, затем дистиллированной водой, которую меняют трижды, и окончательно ополаскивают деионизованной водой. Колпачки от бутылок, силиконовые резиновые прокладки и пробки обрабатывают сходным образом. После высушивания посуда стерилизуется.

РАСТВОРЫ И КОМПОНЕНТЫ РОСТОВЫХ СРЕД

Стерильные растворы

Раствор Олсвера

Цитрат натрия — 8 г.
Хлористый натрий — 4,2 г.
Глюкоза — 20,5 г.

10%-ный раствор лимонной кислоты — 8 мл.

Деионизованная вода — до 1 л.

Стерилизуют автоклавированием. Разливают по 3 мл в универсальные контейнеры.

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса

К готовому раствору (Oxoid Division of Oxo Ltd., Southwark Bridge Road, London S. E. 1) добавляют 1,4%-ный раствор NaHCO_3 (вес/объем), pH которого доведен до 7,0 с помощью CO_2 ; индикатором служит феноловый красный.

Раствор трипсина

Трипсин (Difco 1:250) [Baird and Tatlock (London), Ltd., Freshwater Road, Chadwell Heath, Essex] — 1 г.

Раствор Хэнкса — 100 мл.

Стерилизуют фильтрацией. Сначала из фильтра удаляют примеси, пропуская через систему деионизованную воду. При употреблении 1 мл запасного раствора трипсина разбавляют в 20 мл раствора Хэнкса.

Раствор колхицина

Колхицин $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ (B. D. H. Chemicals Ltd., Poole, Dorset) — 1 мг/мл.

Перед употреблением разбавить до концентрации 0,01 мг/мл раствором Хэнкса. Запасной раствор надо готовить раз в месяц, а разбавленный рабочий раствор приготавливают в день использования. Если запасной раствор предполагают хранить более недели, то его стерилизуют фильтрацией, однако небольшие количества, которые готовят еженедельно и хранят в холодильнике, можно не стерилизовать.

Человеческая плазма для получения плазменных сгустков

5 мл свежей цельной крови добавляют к 3 мл раствора Олсвера, осторожно перемешивают и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин (до тех пор, пока

смесь плазма — антикоагулянт не станет прозрачной). Плазму, кроме нижнего слоя, отделяют и разливают по 1 мл в маленькие бутылочки. По возможности пользуются свежей плазмой, но удовлетворительные сгустки получаются при хранении ее до недели при 4°C .

Для инициации образования сгустка добавляют 0,15 мл 2%-ного хлористого кальция в деионизованной воде к 1 мл плазмы.

КОМПОНЕНТЫ РОСТОВЫХ СРЕД

Основная среда для культивирования тканей

Среда 199 (Morgan, Morton and Parker's medium № 199, 1950), содержащая 200 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Wellcome Reagents Ltd., Wellcome Research Laboratories, Beckenham, BR3 3BS).

Куриный эмбриональный экстракт

Лучше готовить экстракт в лаборатории из десятидневных куриных эмбрионов, а не пользоваться поступающим в продажу. Простой и надежный метод приготовления предложен Полом [8]. Необходимо следить, чтобы поступающие оплодотворенные яйца были хорошего качества; из некоторых партий получается мутный экстракт, причем осадок не удаляется фильтрацией. При добавлении таких экстрактов в ростовую среду на поверхности стекла образуется пленка, которая неблагоприятно сказывается на прикреплении фибробластов. Куриный эмбриональный экстракт (по 20 мл) хранят при глубоком замораживании. Перед употреблением его размораживают и центрифугируют для удаления тонкого осадка, количество которого увеличивается при длительном хранении.

Куриный эмбриональный экстракт можно использовать в течение 6 мес после приготовления, но наиболее удовлетворительные результаты получаются при хранении менее месяца.

Сыворотка

Сыворотку, полученную из крови одного донора с группой крови АВ, стерилизуют фильтрованием. Опалесцирующая сыворотка, содержащая макроскопические липидные частицы, непригодна. Токсичную сыворотку, повреждающую ядро и цитоплазму, а также вызывающую хромосомные изменения, употреблять не следует. Каждый новый источник сыворотки проверяется на культурах контрольных активно размножающихся фибробластов. Для того чтобы свести до минимума эффект токсической сыворотки, рекомендуют смешивать сыворотку от разных доноров. Однако даже смешанная сыворотка может все же существенно снижать рост фибробластов, если в ней содержится сыворотка, обладающая сильным токсическим действием. Контроль каждой партии сыворотки как от одного донора, так и от группы доноров представляет собой крайне важную меру предосторожности.

При отсутствии крови группы АВ можно пользоваться сыворотками, полученными из крови других групп системы АВО. Если нет человеческой сыворотки, можно временно брать телячью или свиную сыворотку, но скорость роста фибробластов при этом сильно уменьшается.

РОСТОВЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР

Среда А

Используется для всех первичных культур.

Среда 199 с антибиотиками — 12 мл.
Сыворотка крови группы АВ — 4 мл.
Куриный эмбриональный экстракт — 4 мл.

Среда Б

Используется для пересевов, которые необходимы для приготовления хромосомных препаратов.

Среда 199 с антибиотиками — 14 мл.
Сыворотка крови группы АВ — 4 мл.
Куриный эмбриональный экстракт — 2 мл.

Среда В

Основная поддерживающая среда, в которой хранятся запасные культуры и осуществляются контрольные пересевы.

Среда 199 с антибиотиками — 16 мл.

Сыворотка крови группы АВ — 4 мл.

КОЖА И ДРУГИЕ ИСТОЧНИКИ ФИБРОБЛАСТОВ

КОЖА

Небольшой кусочек кожи, необходимый для получения культуры фибробластов, легко получить, не причиняя вреда больному, с внутренней поверхности предплечья (у взрослых) или с внутренней поверхности бедра (у детей). Некоторые исследователи предпочитают применять местную анестезию, например, 1%-ным прокаином [9], однако инъекций токсичного вещества вблизи источника клеток лучше избегать. Метод, предложенный Эдвардсом [10], относительно безболезнен в опытных руках, не оставляет постоянного шрама, и кровопотери при этом минимальны.

Выбранный участок кожи очищают 70%-ным спиртом. После того как спирт испарится, участок кожи 6—8 мм длиной и 1—2 мм шириной зажимают заостренным стерильным пинцетом (длиной 11 см) с гладкими концами. Зажатая кожа должна возвышаться над краем пинцета на высоту 1 мм параллельно поверхности кожи бедра или предплечья. В таком положении кожу держат примерно 30 с до тех пор, пока она не станет белой и анемичной. Стерильным хирургическим лезвием проводят вдоль пинцета, и биопсийный материал помещают в маленькие бутылочки со средой 199. Появление небольшого количества крови после снятия пинцета указывает на то, что биопсия достаточно глубокая и захватила слой собственно кожи. Небольшая ранка заклеивается пластырем, который можно удалить через несколько дней.

ДРУГИЕ ИСТОЧНИКИ

Известно, что в случаях с аномалиями половых хромосом нередко прибегают к хирургическому вмешательству для идентификации первичных гонад. Взятый при этом материал первичных гонад, а также материал в какой-то мере дифференцированных яичников и семенников может служить источником фибробластов. Кусочки органов помещают в среду 199, причем необходимо избегать попадания в среду формалина или других фиксаторов, которые используются при фиксации биопсийного материала для гистологического исследования. Особенно широко распространенным источником фибробластов служит материал, полученный при пункционной биопсии, или кусочки тканей семенника, взятые при хирургическом вмешательстве, к которому часто прибегают в случае синдрома Клайнфельтера (XXY). Крошечный кусочек ткани — вот все, что требуется в этом случае для получения культуры фибробластов.

Источником фибробластов с успехом может служить материал, полученный при хирургических абортах. Этот материал особенно ценен при подозрении на аномалию плода главным образом потому, что определить характер хромосомного набора порой можно только по фибробластам. При самопроизвольных абортах материал, как правило, инфицирован, за исключением тех редких случаев, когда плодные оболочки оказываются целыми. Такой материал использовать не следует. Хорошим источником фибробластов служит кожа, взятая от мертворожденных плодов (немацерированных), трупов новорожденных, если после смерти прошло менее 24 ч и если трупы были заморожены. Биопсию, взятую от трупа, нужно поместить по крайней мере на один день в среду, содержащую антибиотики (среду необходимо несколько раз сменить), чтобы уменьшить возможность бактериального заражения.

МЕТОД ОДНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР

Фибробласты и фибробластоподобные клетки кожи и других тканей растут на поверхности сосуда для культивирования и образуют монослой, прочно прикреплен-

ный к стеклу. Когда вся поверхность для роста зарастает клетками, фибробласты формируют многослойный пласт, который в конце концов отделяется от стекла в виде «шариков» из клеток. Пересевать клетки лучше тогда, когда они еще активно размножаются, т. е. до образования сплошного монослоя. Первичные культуры получают во флаконах Карреля диаметром 45 мм и глубиной 10 мм с узким горлом, плотно закрытым силиконовой резиновой пробкой. Главные преимущества сосудов этого типа для закладки культур фибробластов состоят в том, что: 1) сосуды обладают относительно большой площадью для роста клеток по сравнению с объемом культуральной среды; 2) небольшой объем воздуха над средой способствует поддержанию оптимального значения pH; 3) конструкция флаконов позволяет легко соблюдать асептические условия в течение долгого времени.

Фибробласты начинают делиться *in vitro* после некоторого «лаг-периода», длительность которого варьирует в зависимости от источника клеток. В течение этого «лаг-периода» клетки должны быть неподвижными и находиться в контакте с поверхностью флакона для того, чтобы приспособиться к искусственным условиям. Ниже мы приводим описание трех методов получения первичных культур.

1. Метод прямого контакта

Первичный рост фибробластов можно получить непосредственно из кусочков быстро размножающихся тканей эмбрионов или новорожденных, которые помещают во флакон Карреля с таким количеством среды А, которое лишь едва покрывает дно флакона, и насыщают воздух 5% CO₂. Флакон ставят в термостат на 48 ч, в течение которых его не рекомендуют сдвигать или трогать, после чего с помощью инвертированного микроскопа можно наблюдать за образованием выростов фибробластов. К этому времени кусочки прочно прикрепляются к стеклу и для образования монослоя общий объем среды увеличивают до 2 мл.

2. Метод трипсинизации

Суспензию одиночных клеток получают обработкой трипсином измельченного кусочка кожи. Кусочек кожи, полученный при биопсии, помещают в стерильную 6-сантиметровую чашку Петри со стерильным изотоничным 0,04%-ным раствором трипсина и стерильными инструментами разрезают на небольшие фрагменты. После инкубации при 37°C в течение 30 мин при эпизодическом пипетировании жидкости с помощью пастеровской пипетки образуется густая суспензия клеток. Ее центрифугируют, осадок ресуспендируют в 1—2 мл среды А и помещают во флаконы Карреля, которые инкубируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Отдельные клетки и маленькие кусочки ткани, которые осели на стекло, должны начать делиться через несколько дней. Сходный метод описан Фраккаро и др. [11].

В нашей лаборатории нам редко удавалось получать успешные культуры с помощью этой методики. Фибробласты, не адаптированные к условиям *in vitro*, плохо садятся и прикрепляются к стеклу. На их прикрепление к стеклу влияют даже конвекционные токи в культуральной среде. Однако это затруднение можно преодолеть с помощью метода Хсю и Келлога [12] (разработанного на основе метода Эванса и Эрла [13]), предложивших использовать стерильные диски перфорированного целлофана для удержания клеточных агрегатов на месте до тех пор, пока клетки не начнут размножаться.

3. Метод заключения в сгусток плазмы

В сгустке плазмы эксплантаты кожи прикрепляются к поверхности стекла и через некоторое время из них начинается рост клеток. Кусочек кожи, взятый при биопсии, помещают в стерильную 6-сантиметровую чашку Петри с небольшим количеством среды 199 и, пользуясь стерильными ножницами и пинцетом, разрезают на более мелкие кусочки размером от 0,5 до 1 мм. Черная материя или черная бумага под чашкой Петри способствует лучшему измельчению ткани. Если эти кусочки сразу поместить в сгусток плазмы, то в результате дей-

ствия ферментов через несколько дней они могут открепиться от сгустка; в таком случае их необходимо перенести в новый флакон Карреля. Протеолитического переваривания сгустка плазмы можно избежать, если биопсийные кусочки поместить во флакон Карреля с 2 мл среды А с 5% CO₂ в воздухе и инкубировать их в течение 3—7 дней, прежде чем заключить в сгусток плазмы. Предварительная инкубация перед заключением кусочка в сгусток плазмы почти полностью устраняет опасность преждевременного открепления сгустка и не задерживает начала роста культуры.

Как правило, из одной биопсии получают две первичные культуры, в каждой из которых содержится примерно по 6 эксплантатов. Кусочки кожи по отдельности переносят в другую чашку Петри в небольшую каплю плазмы крови человека с антикоагулянтом и встряхивают, чтобы удалить остатки среды 199. Маленькие кусочки удобнее переносить из одного сосуда в другой с помощью пастеровской пипетки, имеющей небольшое сужение около кончика, которое препятствует попаданию кусочка в основную часть пипетки. С поверхности эксплантата удаляют большую часть плазмы и по возможности сухие кусочки переносят в два флакона Карреля. Затем к 1 мл плазмы человека добавляют 0,15 мл стерильного раствора 2%-ного CaCl₂ и тщательно перемешивают. Тонкой пастеровской пипеткой поверх каждого эксплантата наносят небольшую каплю этой смеси, затем ее отсасывают и заменяют свежей (кусочек ткани должен быть полностью покрыт плазмой, а не плавать на поверхности). Размер капли подбирается так, чтобы кусочек ткани мог прикрепиться к поверхности стекла в сгустке и вместе с тем чтобы капля не была слишком большой. Сгусток образуется примерно через 5 мин, хотя это время варьирует для разных доноров и зависит от срока взятия крови. Однако даже при небольшом опыте этого времени вполне достаточно для завершения операции. Флаконы Карреля, заткнутые ватными пробками, помещают в термостат по крайней мере на 30 мин для образования плотного сгустка, затем осторожно добавляют 2 мл среды А, а воздух насыщают 5% CO₂. Ватную пробку заменяют резиновой.

Иногда из-за неточно выполненных процедур некоторые или даже все эксплантаты могут открепиться в течение нескольких часов. В таких случаях рекомендуется удалить открепившиеся кусочки, ополоснуть их в свежей плазме и снова заключить в плазму в новом флаконе Карреля.

ОБРАБОТКА МОНОСЛОЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАФАЗНЫХ ПЛАСТИНОК

ПЕРЕСЕВ КЛЕТОК

После выхода фибробластов из эксплантата клетки начинают быстро размножаться. Примерно через 5—10 дней в зависимости от количества пролиферирующих эксплантатов при микроскопическом исследовании в культуре различим слой фибробластов, покрывающий около $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ всей поверхности дна флакона Карреля. На этой стадии клетки пересевают в большие по размерам флаконы Карреля.

Культуральную среду в исходном флаконе Карреля заменяют слабым изотоническим раствором трипсина. В результате мягкого воздействия трипсина фибробласты приобретают сферическую форму и открепляются от стекла. Примерно через 10 мин действия трипсина (при 37°C) полученную суспензию клеток переносят в стерильную закрытую коническую пробирку и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендируют в 5 мл среды Б и переливают в сосуд для культивирования. Газовую фазу заменяют на смесь воздуха с 5% CO₂, как и в случае первичной культуры, и клетки помещают в термостат при 37°C. В течение 2—3 ч клетки оседают, прикрепляются к поверхности стекла и распластываются, а затем начинают размножаться. Ростовую среду обычно меняют 3 раза в неделю.

Наиболее удобны для культивирования детские «рожки» из стекла пирекс, закрытые резиновыми пробками. Количество метафаз, которое получают при обработке монослоя фибробластов на одной из плоских поверхностей такого рожа, достаточно для хромосомного



Рис. 7.1. Монослой, образованный фибробластами при их субкультивировании.

Среди обычных веретеновидных видны округлившиеся клетки, наличие которых свидетельствует о высоком митотическом индексе.

анализа. После того как клетки первой субкультуры или первого пассажа сформируют монослой, их либо обрабатывают антимитотическим агентом для накопления метафаз и готовят препараты хромосом, либо трипсируют и из суспензии клеток получают культуры второго пассажа в отношении 1:2 или более (рис. 7.1). Таким образом, если препараты хромосом окажутся не-

удовлетворительными, можно использовать клетки последующих пассажей для пересева и повторного анализа хромосом.

В исходных первичных трипсинизированных культурах в большинстве случаев вновь наблюдается рост фибробластов, если во флаконы Карреля добавить свежую культуральную среду и повторно инкубировать. Это может оказаться чрезвычайно важным в том случае, если не удалось получить успешной субкультуры.

Оптимальные условия для образования монослоя фибробластов

Метафазные пластинки (рис. 7.2) для исследования хромосом можно получить лишь в том случае, если однослойную культуру зафиксировать в тот момент, когда часть клеток находится в митозе. Делящиеся фибробласты характеризуются измененной морфологией; из нормального вытянутого веретена они превращаются в сферические клетки, которые в растущих культурах легко распознаются под микроскопом. Используя этот признак, можно провести приблизительную оценку митотического индекса. Максимум митотической активности для первых субкультур наблюдается приблизительно через 18—24 ч после инокуляции при посеве не менее $5 \cdot 10^5$ клеток в 5 мл среды Б.

Можно увеличить митотическую активность, воздействуя на субкультуры холодовым шоком при температуре 4°C в течение 30—60 мин, что частично синхронизирует фазы клеточного цикла [14]. С этой целью в начале следующего дня после посева клеток для кариологического анализа культуры помещают в холодильник при 4°C обычно на 30 мин. Затем их переносят в термостат при 37°C и через 30 мин продолжают обработку. Если после трипсинизации клеток для посева прошло не более 24 ч, то нет необходимости применять холодовый шок, однако клетки, пересеянные раньше этого срока, не дают удовлетворительных результатов без воздействия холодовым шоком. Как правило, максимальную активность получают в том случае, если холодовый шок применяют вскоре после пересева клеток.

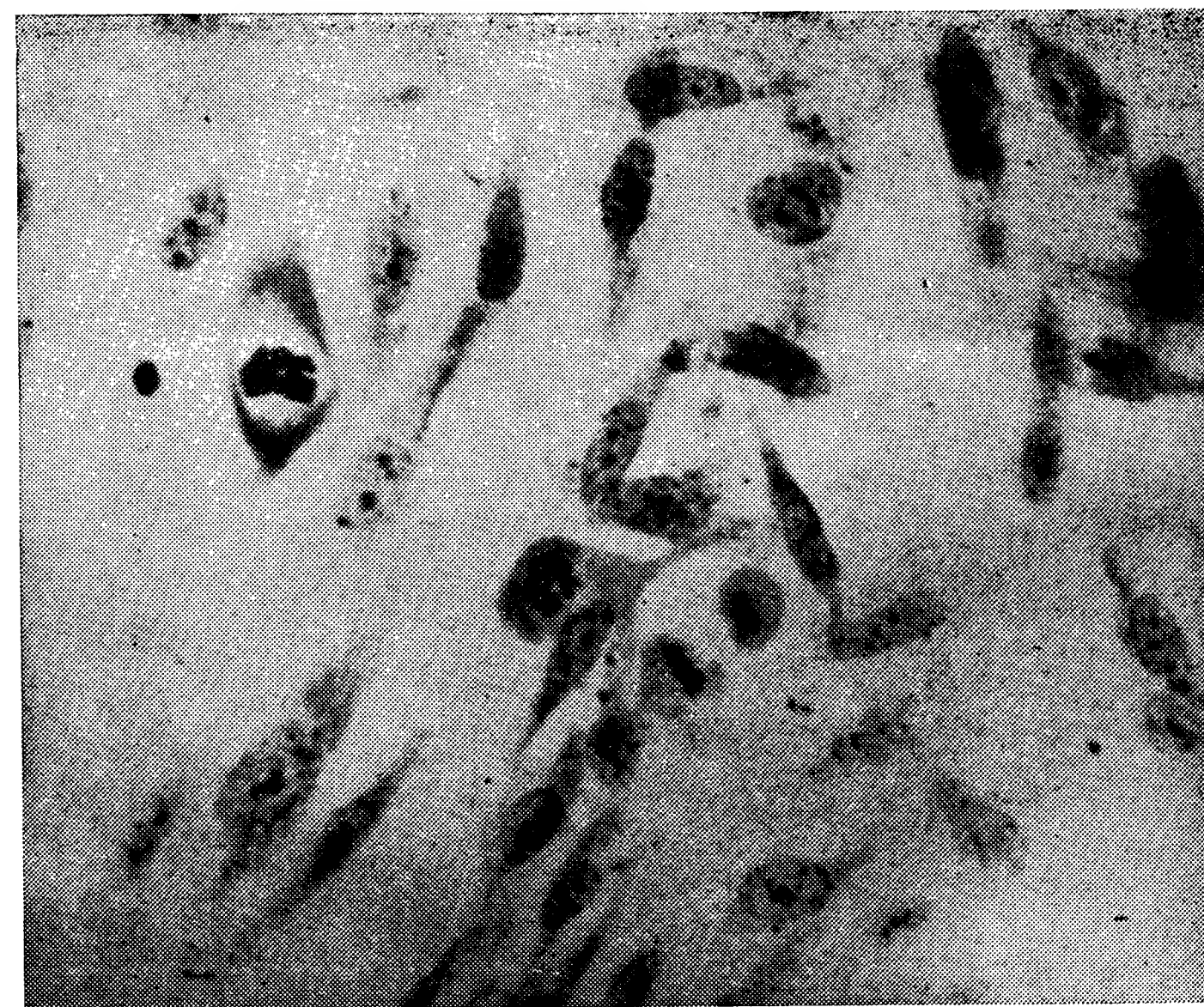


Рис. 7.2. Монослой фибробластов, в котором видны 3 клетки на разных стадиях митоза. Окраска забуференным тионином; $\times 225$.

Обработка колхицином

Метафазные пластинки, пригодные для анализа, можно получить и без использования колхицина. Однако выход метафаз намного увеличивается, если за 4—6 ч до конца культивирования в среду добавить колхицин, который останавливает делящиеся клетки в метафазе, так как подавляет образование веретена. Колхицин добавляют из расчета 0,2 мл раствора на 5 мл среды (0,001 мг/мл в растворе Хэнкса) после холодового шока, когда культура согреется. Приблизительно через 5 ч культуры трипсинизируют и получают суспензию отдельных клеток. После центрифугирования раствор трипсина сливают и клетки осторожно ресуспендируют в теплом растворе Хэнкса.

Обработка клеток после добавления колхицина

Харнден [5] рекомендует пересевать клетки, непосредственно предназначенные для карнологического анализа, на покровные стекла, которые помещают в чашки Петри. Фибробласты, выросшие на покровных стеклах, обрабатывают *in situ* и получают препараты для изучения хромосом. Недостаток этого метода, кроме необходимости иметь некоторые навыки в обращении с хрупкими покровными стеклами, состоит еще и в том, что делящиеся сферические фибробласты легко открепляются от стекла и поэтому могут быть утеряны при фиксации. В митотических клетках, прикрепленных к стеклу, наблюдается плохой разброс хромосом. Фроланд [15] объединил метод Харндена [5] с техникой получения метафазных пластинок для исследования хромосом из венозной крови, описанной Мурхидом и др. [3]. Модифицированный метод Фроланда предполагает на последних стадиях обрабатывать клетки в суспензии. При этом всегда получается хороший разброс метафазных пластинок.

После обработки колхицином среду сливают в мерные конические пробирки и центрифугируют при 1000 об/мин для того, чтобы осадить открепившиеся клетки. Клетки монослая дезагрегируют 0,05%-ным раствором трипсина при 37°C. Полученную суспензию фибробластов соединяют с осадком клеток в центрифужной пробирке, осторожно пипетируют и вновь центрифугируют. Можно избежать небольших потерь клеток на стекле, если центрифужные пробирки и пипетки обработать силиконирующей жидкостью. Для получения хорошей однородной суспензии клеток нужно брать пипетку с узким концом, диаметр которого не превышает 1 мм.

Обработка гипотоническим раствором

Цитоплазма клеток, хотя и не очень плотная, все же достаточно вязкая, чтобы препятствовать разбрасыванию хромосом при разрыве клеточной мембраны. Для того чтобы получить хороший разброс хромосом на метафазных пластинках, клетки обрабатывают гипотони-

ческим раствором. Для этих целей используют 0,95%-ный цитрат натрия [15], 0,7%-ный цитрат натрия [9], 0,17%-ный раствор NaCl [16], 0,075 М KCl [17] и различные разведения раствора Хэнкса (например, [5]). Все эти растворы дают удовлетворительный разброс хромосом в метафазе. Мы используем раствор Хэнкса, разведенный в 4 раза. После отмывания клеток раствором Хэнкса обычной концентрации большую часть надосадочной жидкости сливают; клетки оставляют в 0,5 мл раствора. Затем осторожно, по каплям, добавляют теплую дистиллированную воду до конечного объема 2 мл, так что концентрация раствора Хэнкса уменьшается в 4 раза. В этом разбавленном растворе клетки инкубируют при 37°C в течение 15—20 мин.

Фиксация и получение разброса хромосом

Осадок клеток в конической пробирке, образовавшийся после центрифугирования гипотонического раствора, фиксируют в течение 30 мин смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1), причем фиксирующую смесь лучше готовить непосредственно перед употреблением. После этого сливают надосадочную жидкость и клетки вновь суспендируют в свежем фиксаторе. На этой стадии с помощью силиконированной пипетки Пастера нужно хорошо «разбить» клеточные скопления, чтобы получить равномерную суспензию одиночных клеток. После центрифугирования клетки трижды промывают в свежеприготовленной смеси спирт — уксусная кислота если получается плохой разброс хромосом, то нужна дополнительная смена фиксатора). Наконец, клетки суспендируют в небольшом объеме фиксатора так, чтобы получилась не очень густая опалесцирующая суспензия молочно-белого цвета. Как правило, общий объем должен составлять 0,25 — 0,5 мл.

Разброс хромосом в делящихся клетках осуществляют с помощью модифицированного метода высушивания на воздухе, предложенного Ротфелсом и Симоновичем [18]. Обезжиренные спиртом чистые предметные стекла охлаждают в сосуде Коппина с дистиллированной водой, пока не начнется образование кристаллов льда. Стекло, вынутое из сосуда, покрыто ровной плен-

кой ледяной воды. На верхний конец стекла (стекло держат под углом 45°) наносят каплю клеточной суспензии, которая стекает вниз; слабое обдувание способствует более быстрому распределению клеток по поверхности. Интенсивно помахивая стеклом, препарат несколько подсушивают на воздухе, а затем полностью высушивают над пламенем спиртовки. Процесс высушивания должен быть быстрым и занимать не более 30 с. Высушенный препарат просматривают с помощью микроскопа, чтобы оценить степень разброса делящихся клеток. Приобретая некоторые навыки, можно получать хорошие результаты. Если не удастся таким способом получить хороший разброс в метафазных пластинках, то предметное стекло «поджигают», как только капля клеточной суспензии в фиксаторе расплзется по поверхности влажного охлажденного стекла; однако в результате такого грубого обращения возникают артефакты, в частности расщепление хроматид и утрата хромосом из-за их сильного разброса и разрыва клеточной мембраны. Поэтому в тех случаях, когда это возможно, желательно не применять технику «поджигания».

Препараты, приготовленные методом высушивания на воздухе, можно долгое время хранить либо до окрашивания, либо после окрашивания и заключения. Это явное преимущество описанного здесь метода, поскольку с помощью ранее применявшейся методики давленных препаратов гораздо труднее было получить постоянные препараты. Требовался большой практический опыт, чтобы достичь результатов, сравнимых с результатами, получаемыми при использовании техники высушивания на воздухе.

Предметные стекла с клетками сохраняют в метиловом спирте. Такая дополнительная фиксация (в отсутствие уксусной кислоты) способствует лучшему окрашиванию.

ОКРАШИВАНИЕ ХРОМОСОМ В МЕТАФАЗНЫХ ПЛАСТИНКАХ ФИБРОБЛАСТОВ

Для окрашивания хромосом фибробластов в основном применяются те же методы, которые используются для окрашивания хромосом лейкоцитов человека: реак-

ция Фельгена, различные варианты окрашивания ацето-орсеином и методика Романовского. Для общего анализа хромосом лучше применять методику окрашивания Романовского, которая дает наиболее интенсивную окраску хромосом — от пурпурной до темно-фиолетовой. Препараты, окрашенные по Романовскому, Фельгену или ацето-орсеином, просветляют в высококачественном не содержащем серу ксилоле и хранят в темноте, поскольку на свету они выцветают. Ниже приводится вариант окрашивания раствором Май-Грюнвальд—Гимза. Эта методика проста и дает надежные результаты при окрашивании препаратов, изготовленных методом высушивания на воздухе.

Реактивы

0,1 М фосфатный буфер Серенсена, рН 6,8, разбавляют водой в отношении 1 : 20.

Раствор Май-Грюнвальд — 0,3 г порошка (C. T. Gurr Ltd., Carlisle Road, The Hyde, London, N. W.9) постепенно растворяют в 100 мл метилового спирта при 37°C в водяной бане, затем фильтруют. При использовании краситель разбавляют буфером в отношении 2 : 3.

Усовершенствованный Гарром раствор Гимза. При использовании к 1 ч. красителя добавляют 4 ч. буфера рН 6,8.

Метод

1. Предметные стекла с клетками промывают в свежем метиловом спирте.
2. Окрашивают разведенным свежим раствором Май-Грюнвальд в течение 3—5 мин.
3. Удаляют красящий раствор Май-Грюнвальд и заменяют его разбавленным раствором Гимза на 20 мин.
4. Быстро промывают водопроводной водой.
5. Дифференцируют в буфере до тех пор, пока цитоплазма не станет бесцветной. В большинстве случаев для этого препарат достаточно ополоснуть в буфере.
6. Осторожно промокают фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе.
7. Просветляют в двух сменах ксилола и заключают.
8. Хранят готовые препараты в темноте.

АНАЛИЗ И ФОТОГРАФИРОВАНИЕ ХРОМОСОМ

Анализ метафазных пластинок фибробластов сходен с анализом метафаз трансформированных лимфоцитов из культур лейкоцитов крови. Хромосомы метафазных пластинок фибробластов на препаратах, приготовленных описанным выше способом, как правило, менее конденсированы, чем на препаратах культивированных

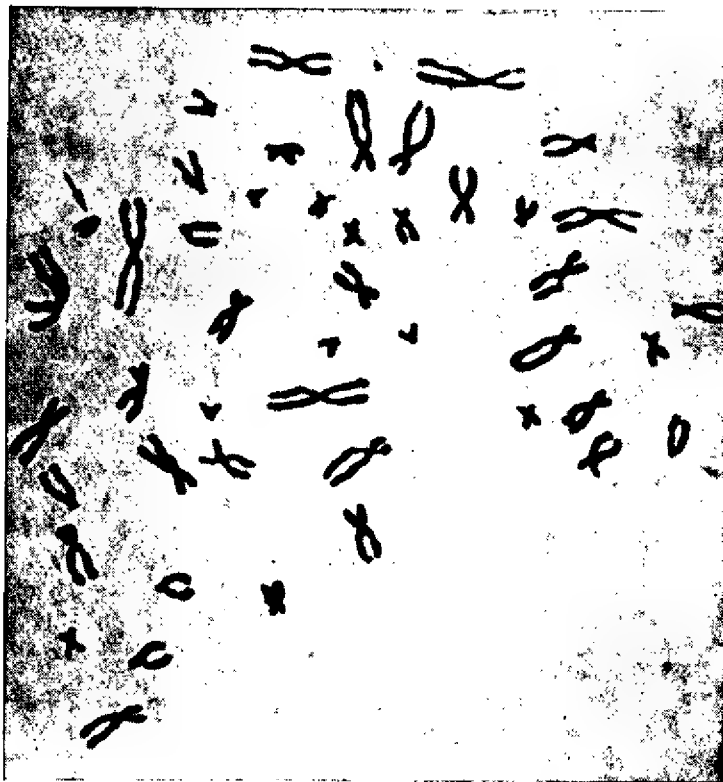


Рис. 7.3. Микрофотография метафазной пластинки фибробласта нормального мужчины ($n=46$, XY). У-хромосома указана стрелкой. Окрашивание раствором Май-Грюнвальд — Гимза; $\times 1000$.

лейкоцитов. Они тоньше и бледнее окрашены, но на них лучше различимы детали строения хромосомы в области вторичных перетяжек, например сателлиты хромо-



Рис. 7.4. Микрофотография метафазной пластинки фибробласта больного с аномальным числом хромосом: одна из хромосом 17-й пары группы E — кольцевая (указана стрелкой). Окрашивание раствором Май-Грюнвальд — Гимза; $\times 1000$.

сом групп D и G. Индивидуальные хромосомы классифицируют и идентифицируют по стандартной системе, рекомендованной Датской исследовательской группой (1960) [19] и на Лондонской конференции (1963) [20]. Стандартная номенклатура, выработанная на конферен-

ции в Чикаго (1966) [21], может быть использована для описания численных и структурных изменений в хромосомном наборе человека.

Необходимыми помощниками при анализе хромосом являются микрофотографии (рис. 7.3 и 7.4). Для достижения максимального разрешения и контраста при фотографировании красновато-пурпурных хромосом, окрашенных по Май-Грюнвальд—Гимза, следует использовать максимально контрастную пленку с высокой разрешающей способностью. Для 35-миллиметровой камеры используют пленку Kodak Recordak Micro-file (тип 5669) в сочетании с зеленым светофильтром Wratten 58. Такую пленку проявляют в особо контрастном проявителе Kodak D8 и в проявителе May and Baker Qualitol. Получающиеся негативы обладают отличным качеством и достаточным контрастом, позволяющим, однако, различать мельчайшие структуры, например сателлиты. Пластины Ilford chromatic G30 или плоскую пленку Kodak Commercial Ortho рекомендуется проявлять в проявителе Qualitol, разведенном водой в отношении 1:19. Для подсчета хромосом пригодны отпечатки размером 12×16 см; для анализа кариотипа — 16×21.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ford C. E., Jacobs P. A., Lajtha L. G., Nature, Lond., 181, 1565 (1958).
2. Tjio J. H., Whang J., Stain Technol., 37, 17 (1962).
3. Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M., Hungerford D. A., Expl Cell Res., 20, 613 (1960).
4. Puck T. T., Cieciura S. J., Robinson A., J. exp. Med., 108, 945 (1958).
5. Harnden D. G., Br. J. exp. Path., 41, 31 (1960).
6. Hyman J. M., J. med. Lab. Technol., 25, 81 (1968).
7. Poulding R. H., Progress in Medical Laboratory Technique, vol. 4, Butterworth, London, 1968.
8. Paul J., Cell and Tissue Culture, 2nd edn, Livingstone, Edinburgh, 1960.
9. Hirschhorn K., Cooper H., Am. J. Med., 31, 442 (1961).
10. Edwards J. H., Lancet, i, 496 (1960).
11. Fraccaro M., Kaijser K., Lindsten J., Ann. hum. Genet., 24, 45 (1960).
12. Hsu T. C., Kellogg D. S., J. natn. Cancer Inst., 25, 221 (1960).
13. Evans V. J., Earle W. R., J. natn. Cancer Inst., 8, 103 (1947).
14. Sinclair W. K., Morton R. A., Nature, Lond., 199, 1158 (1963).

15. Froland A., Acta path. microbiol. scand., 53, 319 (1961).
16. Tjio J. H., Puck T. T., J. exp. Med., 108, 259 (1958).
17. Hungerford D. A., Stain Technol., 40, 333 (1965).
18. Rothfels K. H., Siminovitch L., Stain Technol., 33, 73 (1958).
19. Denver Study Group (1960), Lancet, i, 1063 (1960).
20. London Conference (1963), Cytogenetics, 2, 264 (1963).
21. Chicago Conference (1966), Birth defects: Original article series, II, 2, The National Foundation, New York, 1966.

Глава 8

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ
АНТИТЕЛ К ОДНОСЛОЙНЫМ КЛЕТОЧНЫМ
КУЛЬТУРАМ**

Ш. ХАДСОН

Department of Clinical Virology, St. Thomas's Hospital, London

ВВЕДЕНИЕ

В этой главе изложены принципы метода флуоресцирующих антител, причем особое внимание уделено его использованию применительно к культуре ткани и методам диагностики вирусных заболеваний. Мы не будем останавливаться на всех вариантах метода флуоресцирующих антител, предназначенных для исследования индивидуальных вирусных систем, однако в качестве введения предположим краткое изложение тех успехов, которые были достигнуты в области быстрой диагностики.

Техника флуоресцирующих антител была впервые применена Кунсом и др. [1] для обнаружения антигена пневмококка. С тех пор она широко используется для обнаружения как бактериальных, так и вирусных антигенов. Раньше использование ее было в основном ограничено научными исследованиями, но в последнее время она находит все более широкое применение для быстрой диагностики многих заболеваний. Эту методику можно использовать для определения антигена с помощью специфической антисыворотки, а также для обнаружения специфических антител с помощью известного антигена. В данной главе рассмотрено только первое возможное применение методики.

Как диагностическое средство этот тест имеет особенно большое значение в тех случаях, когда антиген можно непосредственно обнаружить в пробах, полученных от больного, в частности в клетках, взятых из гортани, полости носа или содержащихся в моче. Приведем несколько примеров. Лью [2] выявил антиген вируса

гриппа А в смывах со слизистой из полости носа, а Херс [3] — в мокроте; Лланде-Родас и Лью [4] диагностировали корь при исследовании эпителиальных клеток в осадке мочи. Гарднер и Мак-Квиллан [5] определяли антиген RSV в эпителиальных клетках носоглоточного секрета. Антиген вируса краснухи обнаружен в клетках мазков, взятых из зева.

Установить диагноз, руководствуясь данными, полученными при анализе проб, взятых из организма, возможно не всегда: во-первых, количество клеток для анализа может быть недостаточным; во-вторых, содержать антиген может лишь небольшая часть их. Поэтому желательно, получив пробы, частью их инфицировать культуры тканей. Затем через определенный промежуток времени, продолжительность которого зависит от скорости размножения вируса и особенностей выбранной клеточной системы, в этих клетках с помощью методики флуоресцирующих антител выявляют антиген. Эту методику успешно применяли Мак-Квиллан и Гарднер [7], обнаружившие RSV на ранних стадиях его размножения.

Прежде чем познакомить читателя с самой техникой обнаружения вирусного антигена в культурах тканей, приведем перечень необходимых материалов и опишем методы их получения; укажем также на некоторые трудности, которые могут встретиться в работе, и способы их преодоления.

Наиболее широко применяются два метода флуоресцирующих антител: прямой метод Кунса и др. [1] и непрямой метод Веллера и Кунса [8].

1. ПРЯМОЙ МЕТОД

Сущность прямого метода сводится к следующему. К сыворотке, содержащей специфическую γ -глобулиновую фракцию, добавляют флуоресцирующий краситель; продукт, образующийся в этой реакции, называют конъюгатом. Его наносят на ткань, в которой имеется фиксированный антиген, и инкубируют в течение 30—60 мин при 37°C во влажной камере. Затем избыток красителя смывают и погружают препарат в фосфатный со-

левой буфер не менее чем на 30 мин. За это время буферный раствор несколько раз меняют, чтобы полностью отмыть ткань от конъюгата, не связанного с антигеном.

Препарат помещают на чистое предметное стекло, заключают и исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа.

2. НЕПРЯМОЙ МЕТОД

Этот метод основан на 2 реакциях: сначала неконъюгировавшая иммунная сыворотка реагирует с антигеном; затем препарат тщательно отмывают от свободных антител, после чего добавляют конъюгированный «антивидовой» белок, т. е. белок, специфичный в отношении вида — источника иммунной сыворотки. Реакция протекает 30–60 мин при 37°C. После этого препараты обрабатывают так же, как по методу 1.

ОКРАШИВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТОМ

Эта техника не получила широкого применения. Голдвассер и Шепард [9] показали, что с ее помощью можно выявить антитела в таких разведениях, в которых они другими методами не выявляются. Используют антисыворотку из различных источников, содержащую комплемент морской свинки, и добавляют затем конъюгат против тканей морской свинки. Если используют антисыворотку не от морских свинок, то ее необходимо в течение получаса инактивировать при 56°C для того, чтобы избежать конкуренции между различными типами комплемента за связывание с комплексом антиген—антитело.

Этот метод дает возможность использовать конъюгат против морской свинки с сывороткой любого происхождения. Кроме того, чувствительность его возрастает, если сыворотку сначала инактивируют.

Преимущества и недостатки прямого и непрямого методов

Как можно видеть из рис. 8.1, прямой метод основан на одноступенчатой реакции, тогда как не прямой метод включает две ступени. Кроме того, прямой метод быст-

рее, поэтому использовать его в целях диагностики значительно удобнее. Процесс конъюгации сыворотки не сложен, но трудоемок. Преимущество непрямого метода состоит в том, что один конъюгат можно использовать для разных антигенов. Сейчас выпускаются готовые конъюгаты; качество таких конъюгатов бывает различ-

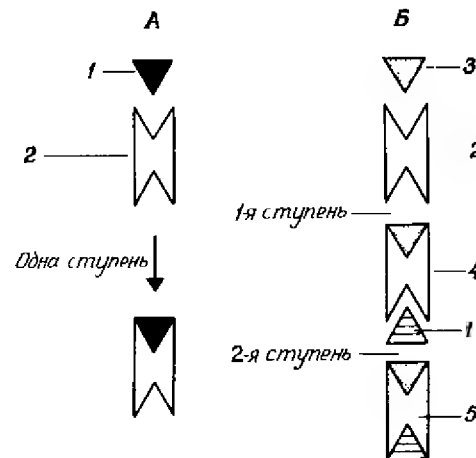


Рис. 8.1. Схема реакций при прямом (А) и непрямом (Б) обнаружении антигенов с помощью иммунофлуоресценции.

1 — меченые γ-глобулины; 2 — антиген; 3 — немеченое антитело; 4 — антиген и антитело; 5 — меченый комплекс антиген — антитело.

ным. Поэтому, чтобы определить пригодность конъюгата, каждую его партию следует проверять в условиях выбранной системы.

Непрямым методом, как правило, более чувствителен. Его можно рассматривать как двойную реакцию антиген—антитело, в которой продукт первой реакции становится антигеном для второй.

ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Флуоресцирующим называют такое соединение, которое поглощает свет одной длины волны, переходит в возбужденное состояние и испускает свет другой длины волны. Из-за потери энергии испускаемый свет всегда

характеризуется большей длиной волны, чем возбуждающий, и, таким образом, не зависит от длины волны поглощенного света. Флуоресценция испускает свет в желто-зеленой области спектра независимо от того, облучен ли он ультрафиолетовым или синим светом.

Для флуоресцентной микроскопии наиболее широко используют такие красители, как лизамин, родамин В (RB 200), Данс (1-диметиламино-нафтаген, 5-сульфоновая кислота) и флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). Последний из них заменил собой флуоресцеинизотиоцианат, первоначально использованный Кунсом, поскольку тиоцианат химически более стабилен. Мы не будем здесь подробно рассматривать метод получения конъюгатов; это не входит в нашу задачу. Описание методики приготовления меченых сывороток можно найти в работе Нейрна [10].

Вещество, которое используется как конъюгат, должно быть стабильным. Его стабильность зависит от многих факторов, например от pH среды или от температуры. Как правило, чем выше температура, тем менее стабилен конъюгат. В запаянных ампулах при -20°C конъюгаты сохраняют активность в течение нескольких месяцев. (Некоторые конъюгаты рекомендуют хранить при $+4^{\circ}\text{C}$.) Очень важно, чтобы после конъюгации активность антител в сыворотке не менялась и не снижались флуоресцирующие свойства красителя. Цвет флуоресцирующего конъюгата должен отличаться от фона ткани.

Все предметы для микроскопирования должны сохраняться в чистоте, поскольку накапливающаяся пыль может влиять на специфическую флуоресценцию. Используют предметные стекла толщиной 1 мм, изготовленные из нефлуоресцирующего стекла. Иммерсионное масло, которое также не должно флуоресцировать, лучше держать в маленьком флакончике, а не в большом пузырьке, в который при частом открывании крышки попадает пыль. Для заключения препаратов используют нефлуоресцирующие среды. Полупостоянные препараты можно заключать в фосфатный глицериновый буфер pH 7,0—7,4; в «DPX» или Polaslipack заключают постоянные препараты.

Объект, над которым помещают фильтр, поглощающий ультрафиолет и тем самым защищающий глаза наблюдателя от действия вредных лучей, облучают сильным источником длинноволнового ультрафиолетового света, например ртутной лампой с высоким давлением, такой, как HBO мощностью 200 Вт. Для защиты от све-

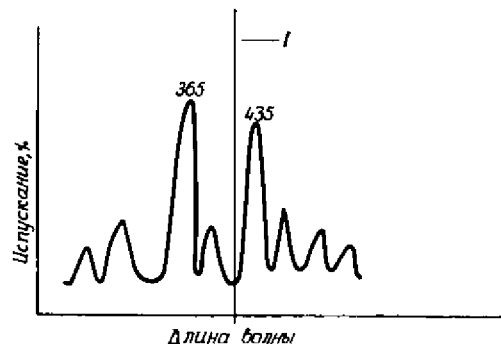


Рис. 8.2. Спектр испускания ртутной лампы HBO 200.
I — первичный фильтр.

тового и ультрафиолетового облучения, а также для гарантии безопасности в случае взрыва лампа полностью закрыта. Срок службы лампы составляет около 200 ч, но ее эффективность заметно снижается уже через 150 ч. Время, в течение которого работает лампа, следует записывать, причем на каждое включение и выключение обычно добавляют 2 ч. Пускорегулирующее устройство обеспечивает высокое напряжение, необходимое для образования дуги. Собираательные линзы, находящиеся внутри лампы, как правило, фиксируют в определенной позиции на заводе. За ними следует теплопоглощающий фильтр, положение которого также фиксировано. При установке новой лампы ее необходимо центрировать. Для этого на выходную апертуру в основании микроскопа помещают листок тонкой бумаги. Слегка закрыв диафрагму микроскопа, лампу располагают таким образом, чтобы изображение дуги между двумя электродами находилось в центре выходной апертуры.

Спектр испускания лампы НВО 200 лежит в пределах 280—600 нм с главными пиками при 365 и 435 нм (рис. 8.2). При работе с ультрафиолетовым светом и темнопольным конденсором длина волны возбуждающе-

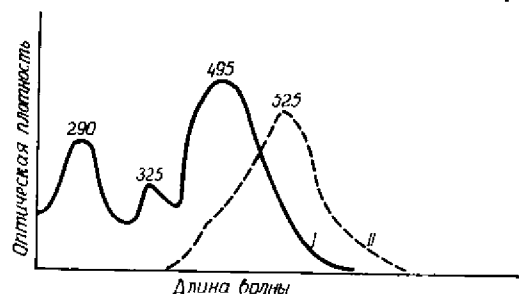


Рис. 8.3. Спектры поглощения (I) и испускания (II).

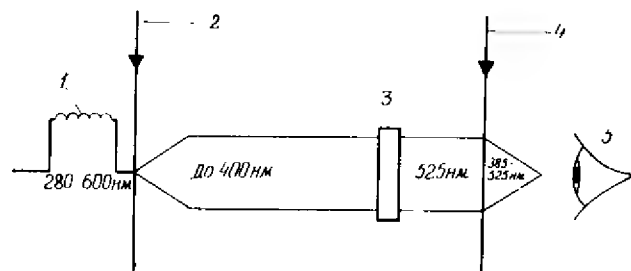


Рис. 8.4. Взаимоотношения между различными частями микроскопа, длиной волны, поглощением и испусканием.

1 — ртутная лампа НВО 200; 2 — первичный фильтр (поглощает видимый свет и тепло); 3 — объект (ФИТЦ поглощает свет и испускает свет с большей длиной волны); 4 — вторичный фильтр (поглощает УФ-свет до 385 нм); 5 — глаз.

го света для ФИТЦ лежит в пределах между 290 и 400 нм (рис. 8.3). Зеленое свечение ФИТЦ лучше всего видно на фоне голубой аутофлуоресценции ткани. Это достигается с помощью расположенного над объектом вторичного фильтра, который поглощает свет с длиной волны до 385 нм. Темнопольный конденсор особенно нужен при микроскопировании с масляной иммерсией, поскольку он уменьшает «цветение» масла за счет

уменьшения освещенного пространства. Такой конденсор, кроме того, рассеивает свет, тем самым направляя его в сторону от объектива, в результате чего большая часть спектра первичного источника используется для стимуляции флуоресценции; темное поле может быть также создано относительно тонким барьерным фильтром. Для того чтобы проходили только одни ультрафиолетовые лучи и поглощались видимые и тепловые, следует пользоваться первичным фильтром. Таким образом, до объекта доходит свет с длиной волны только до 400 нм (рис. 8.4). Пики поглощения для ФИТЦ составляют 290, 325 и 495 нм, а пик излучения — 525 нм.

ФОТОГРАФИРОВАНИЕ

Фотографируют препараты с помощью камеры ЕХА 1А. Для получения цветных диапозитивов используют пленку Kodak Ektachrome, тип В, которая дает удовлетворительные результаты при искусственном освещении. Время экспозиции зависит от интенсивности флуоресценции и составляет 2,5—3 мин. Для получения черно-белых негативов пользуются пленкой Kodak Tri-X. Время экспозиции также составляет 2,5—3 мин (рис. 8.5—8,9).

НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ

Одно из самых важных требований, которые предъявляются к технике флуоресцирующих антител, заключается в том, чтобы получить специфическое окрашивание комплекса антиген—антитело. Флуоресценция должна обнаруживаться только в том участке препарата, где произошла реакция антиген—антитело. Если окрашивание ткани обусловлено не этой реакцией, его называют неспецифическим. Такое окрашивание может быть обусловлено свободным флуоресцирующим красителем в конъюгате, конъюгированными белками сыворотки или какими-то другими неспецифическими конъюгированными антителами.

Свободный флуоресцирующий краситель можно удалить из конъюгата либо гель-фильтрацией на сефадексе,

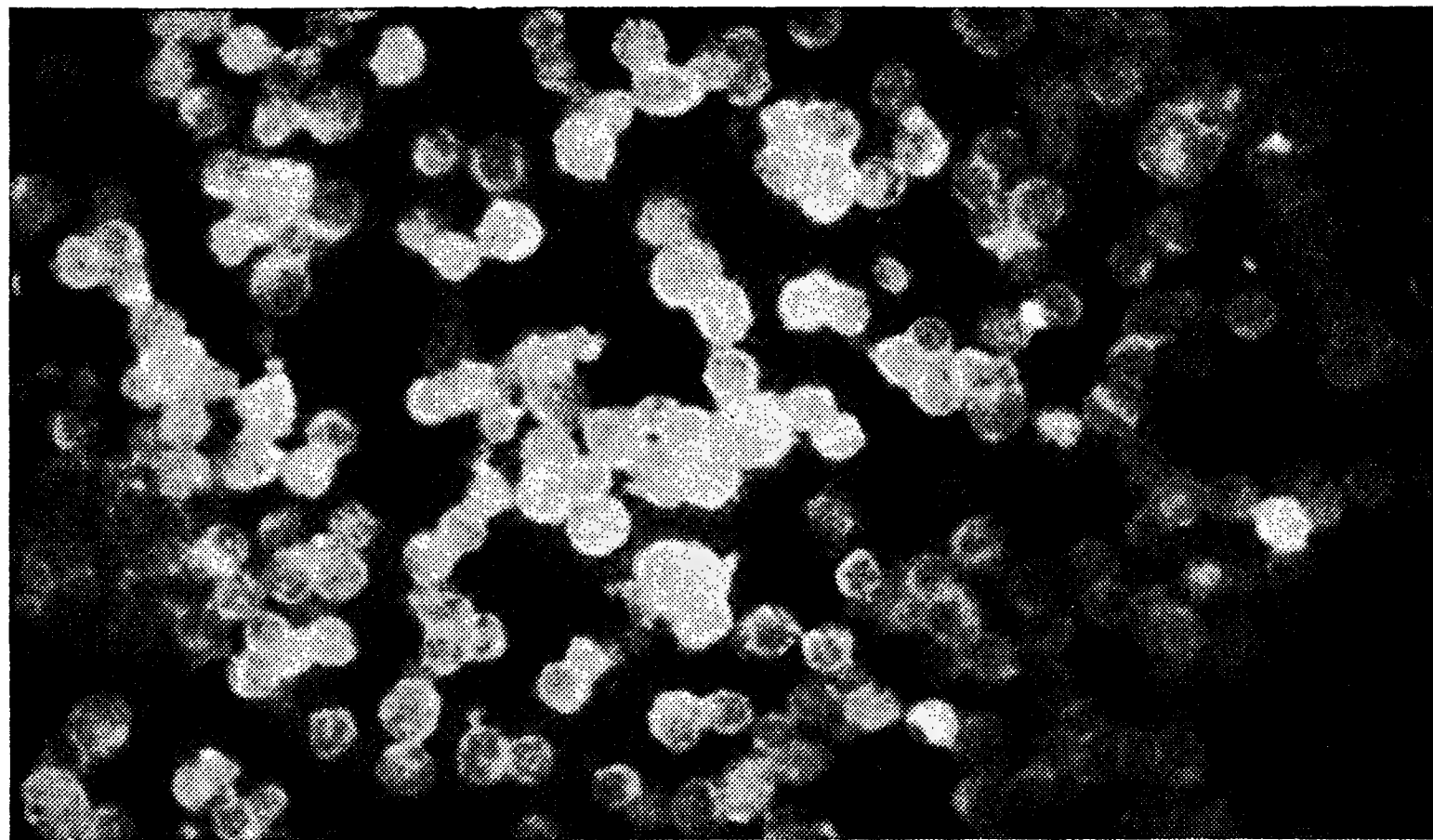


Рис. 8.5. Флуоресцирующие клетки EB₃.

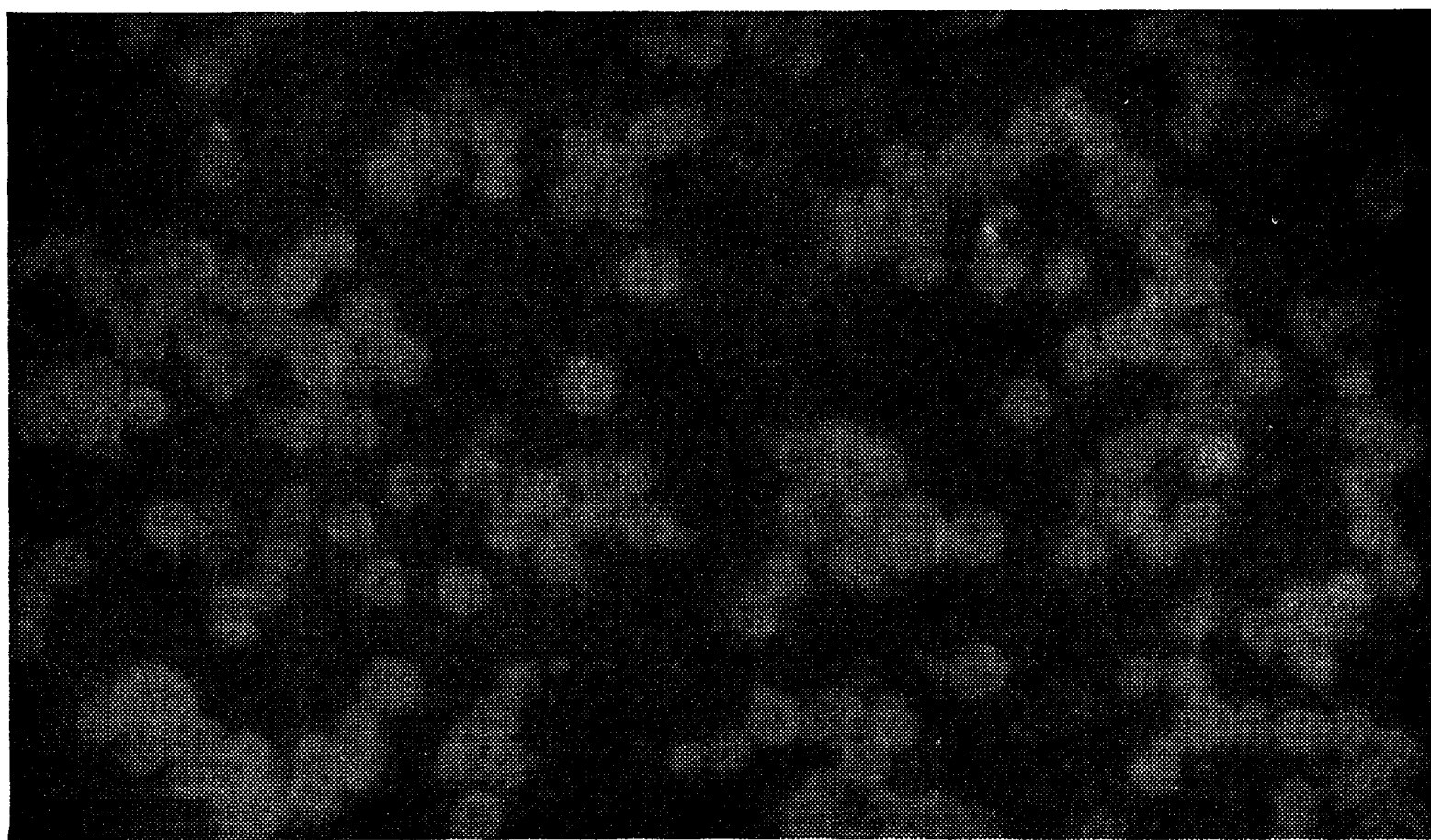


Рис. 8.6. Клетки EB₃ (контроль).

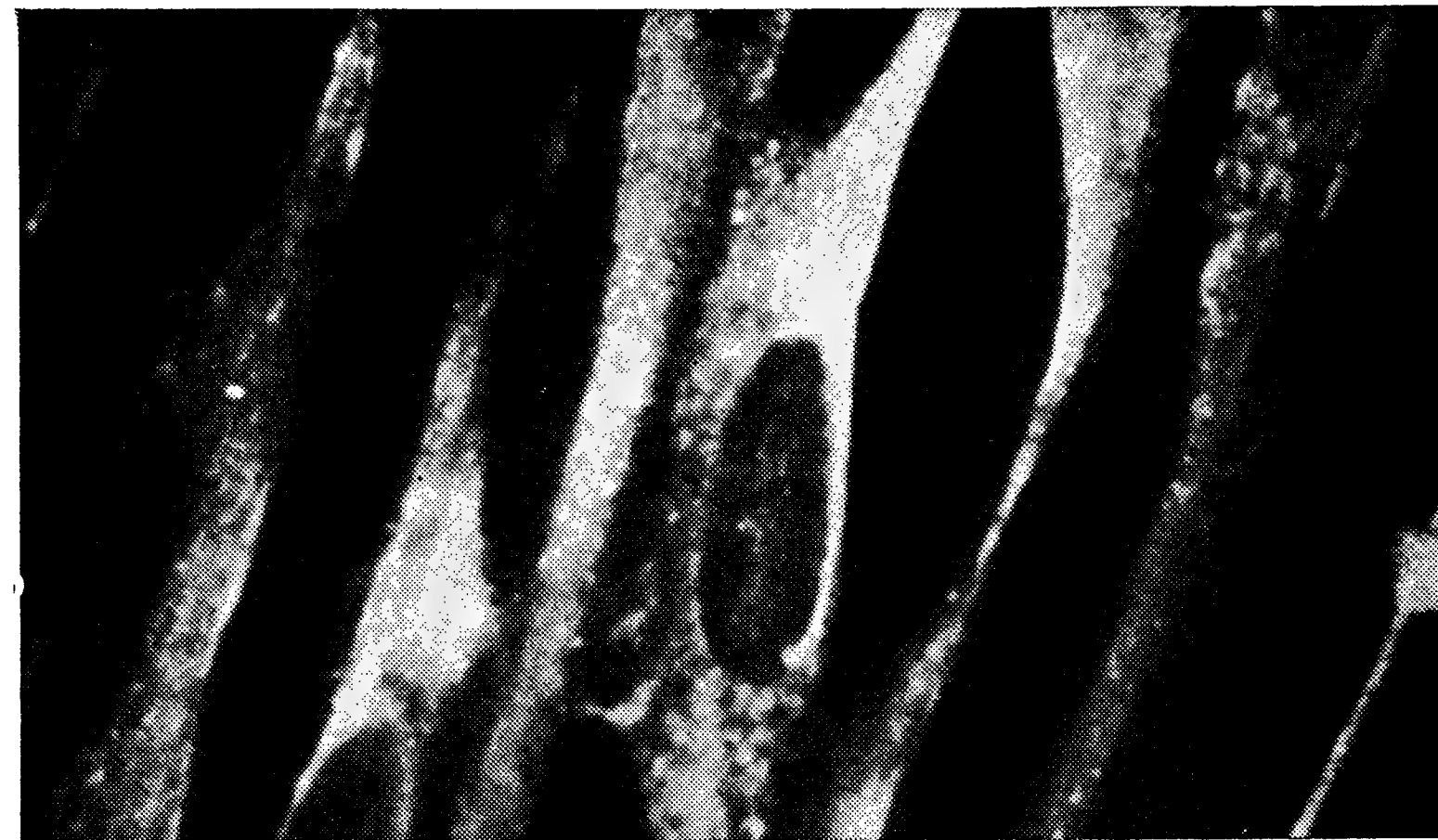


Рис. 8.7. Эмбриональное легкое человека.
Клеточная линия с хронической инфекцией.

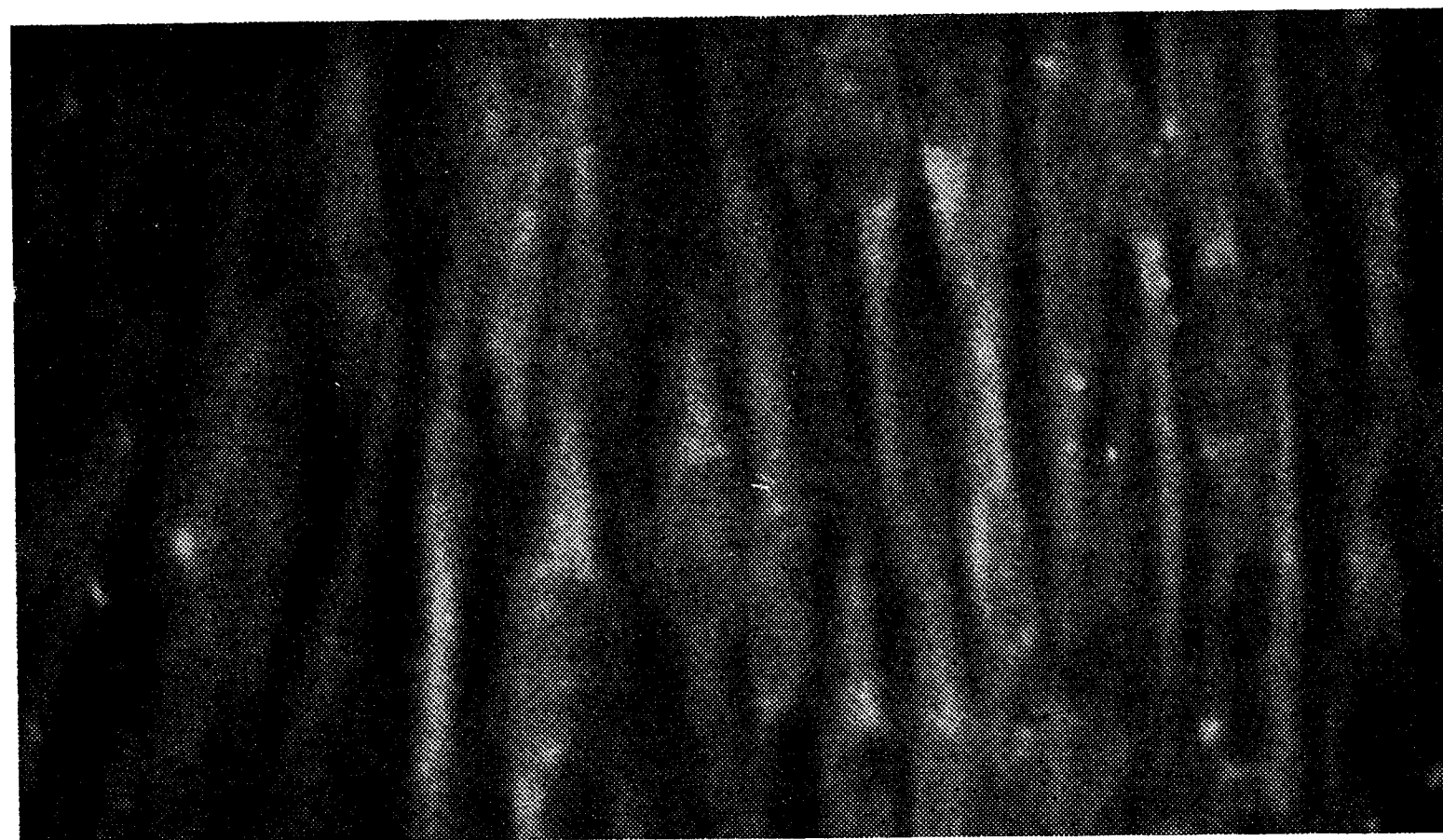


Рис. 8.8. Эмбриональное легкое человека (контроль).

либо в полиакриламидном геле. При использовании готовых конъюгатов, поступающих в продажу, с этим обычно не сталкиваются, однако если конъюгаты неправильно хранят, то происходит их диссоциация.



Рис. 8.9. Клетки RK-13 через три дня после инфицирования вирусом краснухи.

Видна флуоресценция цитоплазмы единичных клеток.

Окрашивание конъюгированными сывороточными белками, по мнению Нейрна [11], обусловлено электростатическими силами между препаратом и сывороточными белками. Такие белки ведут себя как кислые красители и окрашивают положительно заряженные белки тканей. Их можно удалить, адсорбируя сыворотку порошками ткани. Таким же способом можно обработать и флуоресцирующие конъюгаты.

Ниже описан метод, который применяется в лаборатории автора.

АДСОРБЦИЯ КОНЪЮГАТА ПОРОШКОМ ПЕЧЕНИ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОРОШКА ПЕЧЕНИ

Печень только что забитых взрослых мышей (для забивки не следует применять анестезирующие вещества) измельчают ножницами. Примерно по 1 мл полученной кашицы помещают в стерильные пробирки. Пробирку накрывают небольшим кусочком марли и ткань замораживают, помещая пробирки в контейнер с замораживающей смесью, например с сухим льдом и спиртом. Содержимое пробирок затем высушивают замораживанием в течение 24 ч, после чего высушенную ткань переносят в стерильную ступку и измельчают в порошок. Такой порошок хранят в пробирках, закрытых пробками, при $+4^{\circ}\text{C}$. Очень хороший готовый препарат, приготовленный из свиной печени, можно получить от фирмы Wellcome Reagents Ltd.

АДСОРБЦИЯ

Порошок из высушенной замораживанием печени дважды промывают стерильной дистиллированной водой и один раз — фосфатным буфером с pH 7,4. После каждой промывки суспензию центрифугируют. Промытый порошок добавляют к конъюгату из расчета 1 ч. промытого порошка на 5 ч. конъюгата и адсорбируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Смесь перемешивают, но так, чтобы не образовывались пузырьки воздуха. (Можно пользоваться механической мешалкой, включая ее на небольших скоростях, или осторожно перемешивать смесь палочкой каждые 5 мин.) Полученную суспензию центрифугируют в течение 30 мин (1000 об/мин) при $+4^{\circ}\text{C}$. Конъюгат осторожно удаляют и вновь адсорбируют в течение 1 ч новой порцией промытого порошка, после чего опять центрифугируют. Чистую надосадочную жидкость с помощью пипетки разливают в аликвотных количествах по ампулам; ампулы закупоривают и хранят при -20°C .

ОКРАШИВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИТЕЛАМИ СЫВОРОТКИ

Очень часто при получении антисыворотки против вируса, выращенного на клеточной культуре, образуются антитела не только против этого вируса, но и против клеточного материала, который вводится вместе с вирусом. Например, если антисыворотка против RSV получена на кроликах и при добавлении антикроличьего конъюгата к незараженным клеткам HeLa или HEp-2 наблюдают флуоресценцию, то необходимо избавиться от этого неспецифического окрашивания, искажающего результаты. Весьма эффективна в этом случае адсорбция сыворотки тканями, используемыми в исследуемой системе. Метод, дающий хорошие результаты, описан Сандером [13].

Адсорбция сыворотки нормальной тканью

Один миллилитр антисыворотки истощают клетками HeLa или HEp-2, полученными из заросших матрасов Рауса. Смесь клеток с антисывороткой встряхивают механическим способом в течение 90 мин при 37°C, а затем помещают на 18 ч (на ночь) при 4°C. Клетки удаляют центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 мин при +4°C. Для того чтобы определить, удалены ли неспецифические факторы, истощенную сыворотку тестируют против незараженных клеток HeLa и HEp-2.

Определение оптимального рабочего разведения конъюгата и сыворотки

Для того чтобы получить сильную флуоресценцию на минимально окрашенном фоне, необходимо определить оптимальные разведения конъюгата и сыворотки. Для этого разведения сыворотки титруют против разведений конъюгата в присутствии известного антигена в определенной клеточной системе. Если титр обоих компонентов довольно высок, то адсорбция не обязательна, поскольку при используемых разведениях неспецифический эффект может не проявиться.

Снижение неспецифического окрашивания, обусловленного другими факторами

Неспецифическое окрашивание можно уменьшить, соблюдая следующие правила:

1. Брать кровь у больных следует натошак, что уменьшает содержание жировых веществ в сыворотке.

2. Хранить материал при рекомендуемых температурах. Конъюгат и сыворотка должны храниться в небольших аликвотах при -20°C. Стараться не допускать излишних повторных замораживаний и оттаиваний.

3. Всю стеклянную посуду необходимо тщательно мыть. Она должна быть изготовлена из нефлуоресцирующего стекла. Резиновые пробки не должны быть токсичными; желательно использовать пробки из белой или силиконовой резины.

4. Следует пользоваться реактивами квалификации «чистый для анализа» (ч.д.а.). рН фосфатного буфера необходимо довести до 7,2—7,6. Лучше пользоваться реактивами, очищенными биологически, чем на колонках с сефадексом или ДЭАЭ.

5. Если антиген получают в культуре ткани, то лучше брать культуры на самых ранних стадиях заражения вирусом, т. е. сразу после эклиптической фазы размножения вируса. При увеличении цитопатического действия вируса присутствие погибших клеток способствует неспецифическому окрашиванию.

Культуры клеток на покровных стеклах

Однослойные культуры можно выращивать на покровных стеклах разными способами: 1) на «летающих» покровных стеклах; 2) в чашках Петри; 3) в вертикально стоящих пробирках на круглых покровных стеклах.

Покровные стекла, предназначенные для выращивания клеток, кипятят 20 мин в слабом растворе детергента (Rugopex), затем споласкивают 3 раза дистиллированной водой и 3 раза деионизованной водой, 96%-ным спиртом, 99%-ным спиртом и ацетоном (ч. д. а.). Покровные стекла ставят вокруг края чашки на куске фильтровальной бумаги и высушивают. Высушенные

стекла помещают в пробирки размером 100×12 мм, которые ставят в штатив, покрытый алюминиевой фольгой, и стерилизуют сухим жаром.

Пробирки засевают клетками в такой концентрации, которая обеспечит образование монослоя, и плотно закрывают резиновыми пробками. Штатив ставят в термостат наклонно под углом 3° к горизонтали и инкубируют до образования сплошного клеточного слоя. Очень важно, особенно при окрашивании клеток, знать, на какую сторону покровного стекла прикрепилась клетка. Для этой цели можно маркировать стекла, обрезая один из углов. В пробирках такие покровные стекла ориентируют одинаково по отрезанному краю.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ПОКРОВНЫХ СТЕКЛАХ

Для посева на покровные стекла клетки можно брать на 1—4-й день инкубации. Почти все клетки: RK-13 клетки эмбриональных легких человека, почки обезьян, He-La, HEp-2 — хорошо растут на стеклах; исключение составляют GOR, EB₃ и различные линии лимфобластов, которые растут в суспензии и не прикрепляются к стеклу. Составы ростовых и поддерживающих сред для указанных выше клеточных линий приведены в гл. 1.

Преимущество способа «летающих» покровных стекол для выращивания монослоя заключается в том, что перед внесением вируса и фиксации все клеточные культуры можно просмотреть с помощью микроскопа и для окрашивания флуоресцирующими красителями выбрать только те культуры, которые находятся в хорошем состоянии.

Клетки можно выращивать на покровных стеклах, помещенных в чашки Петри. Чашки Петри с инокулированными клетками ставят в термостат при 37°C . Атмосферу насыщают 5% CO_2 . Среду в чашках Петри меняют с помощью пастеровской пипетки.

Другой метод выращивания клеток на покровных стеклах состоит в следующем. Клетки осторожно соскабливают с краев сосуда, в котором их выращивали, и суспендируют в солевом фосфатном буфере. Небольшое количество суспензии помещают на покровное стек-

ло и высушивают. После испарения буфера на покровном стекле остается слой клеток, который можно зафиксировать, погрузив стекло в ацетон. Аналогичным способом получают препараты инфицированных клеток. Однако неприкрепленные клетки имеют тенденцию округляться, поэтому их морфология видна не так отчетливо, как при выращивании непосредственно на покровных стеклах.

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКЛАХ

Для получения монослоя используют также и предметные стекла. Приведем наиболее подходящий для этого метод [12]. К предметному стеклу с помощью нагретой смеси, состоящей из равных объемов парафина и вазелина, прикрепляют стеклянные кольца. Застывший парафин обеспечивает плотный и водонепроницаемый контакт со стеклом. На одно стекло одновременно можно прикрепить до 6 колец. Внутри каждого кольца помещают приблизительно 0,5 мл суспензии, содержащей $5 \cdot 10^3$ — $7 \cdot 10^4$ клеток. Для приготовления суспензии используют ростовую среду. Предметные стекла кладут в чашку Петри и инкубируют при 37°C в термостате, поддерживая определенную влажность. Атмосферу насыщают 5% CO_2 . Клеточный монослой формируется внутри кольца. Смену среды, внесение вируса и т. д. осуществляют с помощью тонкой пипетки. Перед фиксацией кольца снимают пинцетом, а отпечаток их в парафине служит границей участка, где образовался клеточный монослой.

ЗАРАЖЕНИЕ ВИРУСОМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НА ПОКРОВНЫХ СТЕКЛАХ

Клетки, выросшие на покровных стеклах, инфицируют следующим образом. Перед тем как добавить вирус, пробирки просматривают с помощью микроскопа, чтобы убедиться в хорошем состоянии клеток. Затем покровные стекла переносят в стерильную пробирку, соблюдая правила асептики. Это делается для того, чтобы клетки, выросшие на стенках пробирок, не заражались виру-

ом и не конкурировали за питательные вещества с клетками, растущими на покровном стекле. В пробирки с перенесенными стеклами добавляют по 1,6 мл поддерживающей среды и 0,4 мл суспензии вируса. Штатив с пробирками встряхивают на механическом шейкере в течение 1—2 ч при комнатной температуре. Осторожное перемешивание обеспечивает контакт вируса с клетками. Существует и другой способ заражения культур. В этом случае покровные стекла кладут в стерильные чашки Петри. В небольшую чашку Петри обычно помещается 4 покровных стекла. Необходимо внимательно следить за тем, чтобы стекла лежали вверх той стороной, на которой растут клетки. На каждое покровное стекло добавляют по 0,4 мл суспензии вируса и оставляют на 1—2 ч при комнатной температуре. После этого покровные стекла помещают по одному в новые стерильные пробирки, в которые добавляют по 2 мл поддерживающей среды. Клетки сохраняются в хорошем состоянии при смене среды каждые 2 дня.

ФИКСАЦИЯ

Быстро локализовать вирусный антиген в клетке чрезвычайно важно, поскольку очень часто эта локализация характеризует вирус. Ниже приведен метод, при котором сохраняется морфология клеток и местоположение антигена *in situ*. Этот метод пригоден для клеточного монослоя и тонких срезов органов.

Для выявления вирусных антигенов предметные или покровные стекла с выросшими на них клетками погружают на 10 мин в ацетон или этиловый спирт при комнатной температуре или при $+4^{\circ}\text{C}$, после чего ацетон меняют и культуры хранят в ацетоне при -20°C . Существует и другой метод. Препараты обрабатывают ацетоном при $+4^{\circ}\text{C}$, а затем помещают на 30 мин в смесь этилового спирта (95%) и сухого льда при температуре -70°C . После этого ацетон удаляют, а покровные стекла вынимают из пробирок, высушивают на воздухе и хранят при комнатной температуре. Стекла, обработанные таким способом, хорошо сохраняются в течение 2 лет. Каждую исследуемую систему следует предвари-

тельно тестировать с тем, чтобы подобрать такие условия, в которых будут получаться оптимальные результаты.

РЕЗЮМЕ

Обнаружить вирусные антигены с помощью методики флуоресцирующих антител можно только при наличии хорошей специфической антисыворотки с высоким титром и хорошего конъюгата. Клетки культур тканей также должны быть в хорошем состоянии, поскольку мертвые клетки неспецифично захватывают флуоресцирующие конъюгаты. В будущем эта техника, по мнению автора, должна заменить реакцию нейтрализации и, следовательно, ускорить диагноз вирусной инфекции в тканевых культурах. С помощью этой методики можно определять местоположение антигена, в связи с чем ее можно будет применять для быстрой диагностики вирусных заболеваний, используя срезы, полученные непосредственно из тканей больного.

ФИРМЫ, ПОСТАВЛЯЮЩИЕ ПРИБОРЫ И РЕАКТИВЫ

Chance Bros. Ltd., Smethwick 40, Birmingham	Нефлуоресцирующие предметные и покровные стекла
Wellcome Reagents Ltd., Beckenham Kent	Порошок из печени
Standon Scientific Co. Ltd., 65 Pound Lane Willesden, London, N.W.10	Микроскопы
Polaron Equipment Ltd., Delvillem House, Shakespeare Road, Finchley, London, N.3.	Polarfluor B (для заключения)
Oxoid Division, Oxo Ltd., London, S.E.1.	Солевой фосфатный буфер в таблетках

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Coons A. H., Creech H. J., Jones R. N., Berliner E., J. Immun., 45, 159 (1942).
2. Liu C., Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 92, 883 (1956).
3. Hers J. F., Am. Rev. resp. Dis., 88 (Suppl.) 333 (1963).
4. Llanes-Rodas R., Liu C., New Engl. J. Med., 275, 516 (1966).
5. Gardner P. S., McQuillan J., Br. med. J., 3, 340 (1968).
6. Haire M., Lancet, i, 920 (1969).
7. McQuillan J., Gardner P. S., Br. med. J., 1, 602 (1968).

8. Weller T. H., Coons A. H., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 86, 789 (1954).
9. Goldwasser R. A., Shephard C. C., J. Immun., 80, 122 (1958).
10. Nairn R. C., Fluorescent Protein Tracing, 2nd edn, p. 119, Livingstone, Edinburgh, 1962.
11. Nairn R. C., Fluorescent Protein Tracing, 2nd edn., p. 125, Livingstone, Edinburgh, 1962.
12. Sommerville R. G., J. clin. Path., 20, 212 (1967).
13. Sander G., J. clin. Path., 22, 737 (1969).

Глава 9

КУЛЬТУРА ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК
ИЗ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

Р. ПОЛДИНГ

Department of Pathology, Southmead Hospital, Bristol

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы благодаря развитию методов культивирования клеток зародыша, обнаруженных в амниотической жидкости, полученной при трансабдоминальном амниоцентезе, многие биохимические и цитогенетические дефекты зародыша стало возможным диагностировать на ранних стадиях беременности. Небольшая часть клеток, которые отслаиваются в жидкость, окружающую плод, способна делиться, и через 2—4 нед в зависимости от исходной концентрации жизнеспособных клеток из них можно получить однослойную культуру преимущественно эпителиоподобных клеток. Для цитогенетических исследований хромосомного набора зародыша используют первичные культуры или первые субкультуры. Клетки, накопленные от нескольких пересевов, исследуют биохимически для определения возможных нарушений метаболизма, в частности таких, которые связаны с ферментной недостаточностью.

Весьма важно, что сейчас по результатам цитогенетического или биохимического анализа можно решать вопрос о прерывании беременности, если к этому имеются показания. Хотя аборт с помощью гипертонического солевого раствора можно вызвать и на 24-й нед развития, все же беременность следует прерывать не позднее 20 нед [1]. Поскольку для анализа культивируемых клеток необходимо 4 нед (может потребоваться повторная процедура), проба амниотической жидкости должна быть взята не позднее 16 нед беременности. Было показано [2], что число жизнеспособных клеток на единицу объема амниотической жидкости увеличи-

вается с 11 по 34 нед. Амниоцентез лучше проводить между 15-й и 18-й нед, поскольку в этот период шансы на успешное культивирование клеток наиболее велики и еще есть время для искусственного прерывания беременности.

Таким образом, основная проблема, связанная с культивированием зародышевых клеток из амниотической жидкости для внутриутробной диагностики,— это получение в течение 4 нед клеток в количествах, достаточных для хромосомного анализа и биохимического исследования.

ЦИТОЛОГИЯ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ НА 16-Я НЕДЕЛЕ БЕРЕМЕННОСТИ

На 16-й неделе беременности теменно-кобчиковая длина зародыша человека составляет приблизительно 160 мм, а его вес—около 100 г. Он окружен 100–250 мл амниотической жидкости. Плодный пузырь создает зародышу водную среду, обеспечивающую стабильные условия роста, а также защищает его от механических повреждений.

Амниотическая жидкость образуется за счет поступления внеклеточной жидкости зародыша через первичную кожу, а после 12 нед—также за счет мочи зародыша. На этой стадии жизненного цикла амниотическая среда, вероятно, находится под контролем тех же гомеостатических механизмов, что и сам зародыш [3].

Со стороны, обращенной к зародышу, амнион выстлан внезародышевой эктодермой, которая переходит в эпителий кожи и слизистых полости рта и носа, а также конечных отделов пищеварительного тракта и моче-полового пути зародыша. У эмбрионов на ранних стадиях амниоэктодермальное соединение находится на вентральной стенке; по мере развития зародыша оно сохраняется в виде наружных частей пупочного канатика. До 32-й нед беременности эктодерма амниона состоит из низких кубических клеток, которые затем сменяются высокими цилиндрическими [4]. Непрозрачный участок прозрачного в норме амниона, как было обнаружено, состоит из слоя эпителиальных клеток, напоминающих участок плоскоклеточной метаплазии [5].

Таким образом, на 16-й нед беременности клеточная популяция амниотической жидкости состоит главным образом из слущенных клеток эктодермального происхождения: из эпителия амниона, эпидермиса кожи, а также эпителия потовых и сальных желез, ротовой полости и частично пищеварительного тракта и моче-половых путей. Так как на ранних стадиях развития зародыш заглатывает амниотическую жидкость, то теоретически при амниоцентезе в пробу могут попадать слущивающиеся эпителиальные клетки энтодермального происхождения из гортани, пищевода, желудка, тонкого кишечника и трахеи. Число клеток в пробе амниотической жидкости широко варьирует не только на разных сроках беременности, но даже в разных пробах, взятых у пациента в одно и то же время. Ясно, что многое зависит от распределения отслоившихся клеток в момент взятия пробы. Вотта и др. [6] на 28—37-й нед беременности обнаружили 400—2800 клеток в 1 мл, в среднем 833,9, а в конце беременности (37—40-я нед)—в среднем 2721 клеток в 1 мл. Вальштрём и др. [2], используя трипановый синий для определения жизнеспособных клеток в клеточных суспензиях, обнаружили, что число живых клеток в 1 мл амниотической жидкости на 16-й нед беременности составляет в 4 различных случаях 1940, 3720, 4500 и 5600 (среднее 3955). Это означает, что в 10 мл пробы, взятой в указанный период, содержится около 20 000—50 000 живых клеток, но, поскольку в клеточных культурах из амниотической жидкости наблюдается всего лишь несколько фокусов роста, по-видимому, лишь небольшая часть клеток обладает способностью к росту.

ТИПЫ КЛЕТОК, ОБНАРУЖЕННЫЕ В АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ НА 16-й НЕДЕЛЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Клетки амниона

Несколько уплощенные кубовидные до 25 мкм в диаметре клетки с большим пузыревидным ядром и плотной эозинофильной цитоплазмой, часто вакуолизированной;

амниотические клетки иногда образуют шарики или гроздьи, вероятно, вследствие скручивания слущенного слоя клеток, выстилающих амнион.

Клетки плоского эпителия из эпидермиса плода

Крупные поверхностные клетки 25—80 мкм в диаметре с обильной эозинофильной или цианофильной цитоплазмой. Ядро округлое, часто пикнотическое. Основную массу плоских клеток, отслаивающихся в амниотическую жидкость, составляют безъядерные клетки или клетки с «теньями» ядер.

Группы недифференцированных клеток

В большинстве проб амниотической жидкости содержатся небольшие группы малодифференцированных клеток неизвестного происхождения. Размеры таких групп варьируют от 25 до 30 мкм. Каждая группа состоит из плотно упакованных клеток менее 10 мкм в диаметре со скудной цитоплазмой и округлым бледно-окрашивающимся ядром. Вероятнее всего, источником этих клеток служит энтодермальный эпителий дыхательного пути, пищеварительного тракта или моче-половых путей. По-видимому, именно эти клетки способны размножаться и давать начало эпителиальному росту в первичных культурах.

Фагоцитирующие клетки

В большинстве проб встречается небольшое число мелких фагоцитирующих клеток, напоминающих макрофаги или гистиоциты. Судя по окрашенным мазкам, можно сказать, что они жизнеспособны, активно фагоцитируют и часто содержат в цитоплазме большую вакуоль. Эти клетки являются либо материнскими по происхождению, либо происходят из мезенхимы зародыша.

Эритроциты и лейкоциты

Наличие в некоторых пробах небольшого числа эритроцитов и иногда лейкоцитов обусловлено, по-видимому, попаданием материнской крови во время амниоцентеза.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В 1956 г. [8] появилось сообщение об определении «хромосомного» пола плода на основании исследования полового хроматина в клетках амниотической жидкости. Только в 1963 г. Фукс и Филип [9] получили культуру клеток амниотической жидкости, однако в своей работе они не приводили никаких данных относительно техники культивирования. Впоследствии было создано много разнообразных методик [10—16], причем в последних наиболее совершенных методиках удалось значительно сократить время, необходимое для получения достаточного количества клеток с целью изучения хромосом, а также увеличить выход успешных культур. Во всех этих методах среда для культивирования в основном сходна — основная среда определенного состава, такая, как среда Игла, 199 или Хэма F-10 с добавлением 15—30% бычьей эмбриональной сыворотки. Клетки культивируют в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Исключение составляет метод Сантессона [13], в котором вместо бычьей эмбриональной сыворотки используют 20% человеческой сыворотки (от нескольких доноров) и 5% бычьего эмбрионального экстракта.

Бычий эмбриональный экстракт и бычья эмбриональная сыворотка, по-видимому, содержат важный ростовый фактор(ы), способствующий(ие) росту эпителиоподобных клеточных культур, при условии, что в пробе амниотической жидкости находится достаточное число живых клеток, способных к делению. Мы не знаем, какова должна быть плотность эмбриональных клеток, необходимая для инициации культуры, но наиболее быстро клетки растут в том случае, когда клеточную популяцию из пробы амниотической жидкости концентрируют в 1 или 2 сосудах, имеющих небольшую поверхность, к которой могут прикрепиться клетки. Для этой цели подходят стандартные пробирки Лейтона или флаконы Карреля. Что касается времени образования монослоя, то в этом отношении клетки зародыша не отличаются от большинства других клеток; иными словами, скорость образования ими монослоя зависит главным образом от их плотности на единицу площади флакона.

для культивирования. Критическая плотность клеток обеспечивает оптимальную концентрацию диффундирующего фактора роста, которая зависит от расстояния между жизнеспособными клетками, способными к росту [17]. Для повышения эффективности посева проб, в которых



Рис. 9.1. Эпителиоидные клетки на 20-е сутки культивирования. Однослойная культура, полученная из пробы амниотической жидкости, взятой на 15-й нед беременности (фазовый контраст, 500X).

содержится небольшое число клеток, Стил и Брег [10] применили метод слоя-кормилки: они высевали клетки амниотической жидкости на слой облученных фибробластов.

Фог и Лунд [18] первыми получили перевиваемую линию эпителиальных клеток из амниона человека. Для роста клеток была использована среда, содержащая раствор Эрла, 20% бычьей сыворотки и гидролизат лактальбумина.

Хотя, по-видимому, нет определенных данных о том, что клетки амниона сохраняют способность к росту по-

сле отслаивания в амниотическую жидкость, морфология плоских эпителиоидных клеток линии FL сходна с морфологией клеток амниотической жидкости, культивируемых в среде 199 с 30% бычьей эмбриональной сыворотки (рис. 9.1). Наиболее вероятно, что клеточным культурам из амниотической жидкости дают начало разные типы клеток, а именно клетки амниона и недифференцированные клетки энтодермального происхождения; при этом образуются колонии, состоящие из фибробластоподобных и эпителиоидных клеток. Через несколько пассажей в быстрорастущих культурах преобладают фибробластоподобные клетки, хотя в большинстве случаев первичные культуры имеют эпителиоидный тип роста.

Из многих методов культивирования клеток амниотической жидкости мы включили в эту главу методы Сантессона [13] и Надлера и Джерби [16], поскольку указанные методы позволяют в кратчайший срок получить препараты для анализа хромосом, причем случаи успешных культур составляют почти 100%. Кроме того, здесь описан простой метод, которым мы пользуемся в лаборатории (Department of Pathology, Southmead Hospital, Bristol). Применение этого метода, хотя и не столь быстрого, обеспечивает успешное культивирование клеток большинства проб как для цитогенетического, так и для биохимического исследований. Все методы культивирования предусматривают инкубирование клеток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

МЕТОД А [13]

Объем пробы. Для анализа берут 10 мл пробы.

Сосуды для культивирования. Флаконы Карреля диаметром 50 мм и пластиковые чашки Петри диаметром также 50 мм.

Культуральная среда. Равные части сбалансированного солевого раствора Хэнкса и среды 199, 20% смешанной человеческой сыворотки, 5% бычьего эмбрионального экстракта (Difco), антибиотики,

Метод

Пробы жидкости по 3 мл центрифугируют, осадок клеток промывают средой. Суспензию клеток из каждой пробы сеют в отдельный сосуд для культивирования. Рост становится заметным через несколько дней; спустя 4—12 сут клеток становится достаточно для исследования хромосом и пересева.

МЕТОД Б [16]

Объем пробы. 10 мл пробы собирают либо в пластиковые, либо в силиконизированные стеклянные пробирки.

Сосуды для культивирования. Небольшие чашки Петри фирмы Falcon.

Среда для культивирования. Среда F-10 с 15% эмбриональной бычьей сыворотки, в которую добавлена смесь антибиотиков против бактериальной и грибковой инфекций.

Метод

После центрифугирования осадок клеток суспендируют в 0,5 мл эмбриональной бычьей сыворотки и разливают в 5 чашек Петри. Клетки иммобилизуют, положив на них покровное стекло, затем добавляют 2—3 мл среды. Среду меняют через день, пока под покровными стеклами не вырастут колонии (обычно это бывает на 7—18-й день), после чего покровные стекла вынимают, переворачивают и помещают в новые чашки Петри для получения новых культур. В обе культуры добавляют свежую среду. Через 24 ч после соответствующей обработки растущих на этом покровном стекле клеток получают препарат хромосом; субкультуру после некоторого числа пересевов используют для биохимического исследования.

МЕТОД В [14] (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ)

Объем пробы. Для анализа берут 10 мл пробы.

Сосуды для культивирования. Флаконы Карреля диаметром 50 мм, стандартные стеклянные пробирки Лейтона с площадью для культивирования 40×10 мм.

Среда для культивирования. Среда 199 (Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, Kent) с 30% эмбриональной бычьей сыворотки (Flow Laboratories, Ltd., Irvine, Ayrshire).

Метод

1. Пробы центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5—10 мин.

2. Если в осадке клеток содержится примесь крови, то его ресуспендируют в 1 мл среды 199 и добавляют 8 мл 0,83%-ного раствора хлористого аммония (охлажденного до 4°C), который частично лизирует эритроциты [19]. Эту смесь оставляют на 3 мин при 4°C, а затем добавляют 1 мл эмбриональной бычьей сыворотки, чтобы остановить лизис клеток. Повторным центрифугированием получают осадок клеток.

3. Клетки ресуспендируют в 3 мл среды.

4. 1 мл клеточной суспензии помещают в пробирку Лейтона, а оставшиеся 2 мл — во флакон Карреля при 37°C в атмосферу с 5% CO₂ на 6 сут.

5. На 7-е сут среду из обоих сосудов осторожно сливают в стерильную центрифужную пробирку. К клеткам добавляют свежую среду, а слитую надосадочную жидкость центрифугируют в течение 10 мин при 100 об/мин. Клетки, которые не осели, помещают в пробирку Лейтона и используют для получения еще одной культуры.

6. На 14—21-е сут, когда эпителиоидные клетки займут площадь около 200 мм², одну из культур обрабатывают колхицином для накопления метафаз. Когда в оставшихся культурах число клеток достигнет определенной величины, получают субкультуры, которые затем используют для биохимического и дополнительного цитогенетического исследования.

Для получения препаратов хромосом первичные культуры обрабатывают так же, как и культуры фибробластов (гл. 7).

Однако обычно клетки с поверхности, на которой они растут, снимают более концентрированным раствором трипсина (0,25%), а иногда для этой цели необходимо пользоваться стеклянным скребком. Полученную кле-

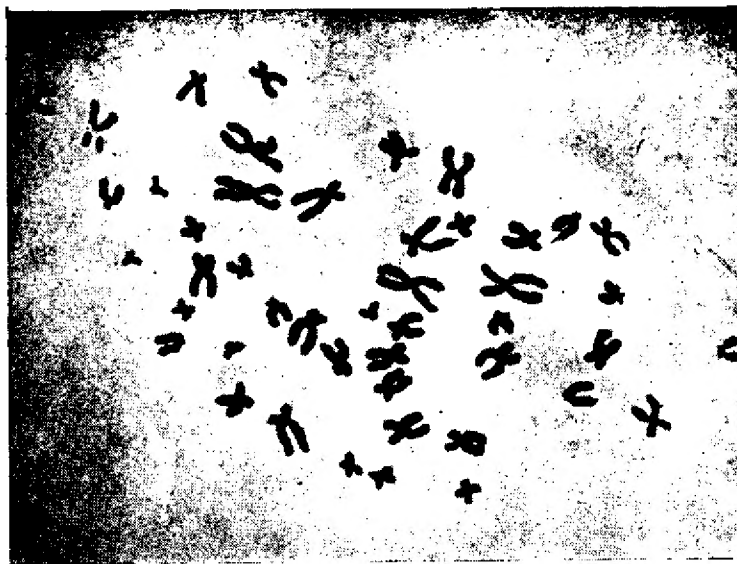


Рис. 9.2. Метафазная пластинка, полученная после обработки кол-хицином культуры клеток амниотической жидкости на 2-й день инкубации (Май-Грюнвальд—Гимза, 500 X).

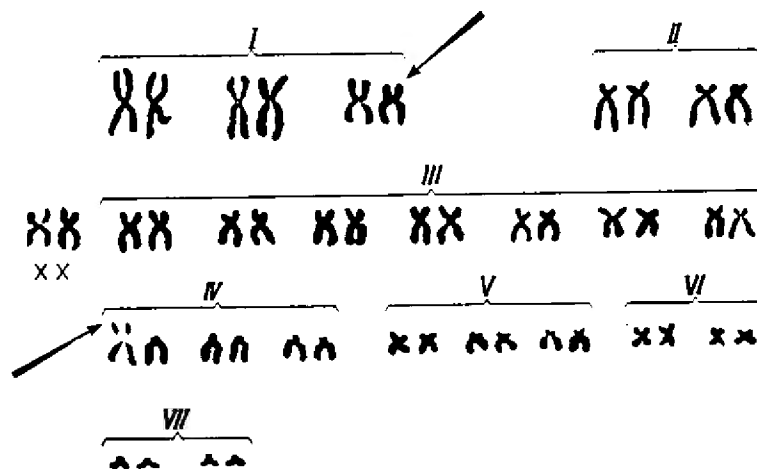


Рис. 9.3. Карниотип клетки, изображенной на рис. 2, представленный согласно Денверской классификации.

Стрелки указывают транслокацию части хромосомы А3 на короткие плечи одной из хромосом группы D. Анализ карниотипа указывает, что пол плода женский и что плод имеет сбалансированную хромосомную аномалию. I — группа А (1—3); II — группа В (4—5); III — группа С (6—12); IV — группа D (13—15); V — группа Е (16—18); VI — группа F (19—20); VII — группа G (21—22).

точную суспензию обрабатывают гипотоническим раствором, фиксируют, окрашивают и анализируют точно так же, как и суспензию фибробластов. Число клеток, получаемых из первичной культуры клеток амниотической жидкости, значительно меньше, чем из однослойных культур фибробластов первого или второго пересевов. Поэтому следует очень осторожно обращаться с культурой при центрифугировании и пипетировании, чтобы избежать потери клеток. Препараты хромосом, приготовленные с помощью этого метода, по своему качеству не уступают препаратам хромосом из культур лимфоцитов и фибробластов, что чрезвычайно важно при выявлении аномалий в структуре хромосом (рис. 9.2 и 9.3).

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Creaseman W. T., Lawrence R. A., Thiede H. A., J. Am. med. Ass., 204, 949 (1968).
2. Wahlström J., Brosset A., Bartsch F., Lancet, ii, 1037 (1970).
3. Lind T., Hytten F. E., Lancet, i, 1147 (1970).
4. Wachtel E., Gordon H., Olsen E., J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw., 76, 596 (1969).
5. Potter E. L., Pathology of the Fetus and Infant, 2nd edn, Year Book Medical Publishers Inc., Chicago, 1961.
6. Votta R. A., Bobrow De Gagnelet C., Parada O., Giulietti M., Am. J. Obstet. Gynec., 102, 571 (1968).
7. Pertoft H., Bäck O., Lindahl-Kiessling K., Expl Cell Res., 50, 355 (1968).
8. Fuchs F., Ris P., Nature, Lond., 177, 330 (1956).
9. Fuchs F., Philip J., Nord. Med., 69, 572 (1963).
10. Steele M. W., Breg W. R., Lancet, i, 383 (1966).
11. Jacobson C. B., Barter R. H., Am. J. Obstet. Gynec., 99, 796 (1967).
12. Nadler H. L., Pediatrics, 42, 912 (1968).
13. Santesson B., Akesson H. O., Böök J. A., Brosset A., Lancet, ii, 1067 (1969).
14. Gregson N. M., Lancet, i, 84 (1970).
15. Nelson M. M., Emery A. E. H., Br. med. J., 1, 523 (1970).
16. Nadler H. L., Gerbie A. B., New Engl. J. Med., 282, 596 (1970).
17. Rubin H., Rein A., Growth Regulating Substances for Animal Cells in Culture, p. 51, Wistar Institute Press, Philadelphia, 1967.
18. Gogh J., Lund R. O., Proc. Soc. wxp. Biol. Med., 94, 532 (1957).
19. Lee C. L. Y., Gregson N. M., Walker S., Lancet, ii, 316 (1970).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие редактора английского издания	6
Глава 1. Среда для культивирования клеток млекопитающих.	
<i>А. Витакер</i>	7
Общие замечания	7
Практические рекомендации	12
Сбалансированные солевые растворы	1
Ростовые среды	18
Естественная среда	81
Среды, состоящие из естественных компонентов и химически определенных веществ	19
Среды с определенным составом	22
Поддерживающие среды	27
Выбор среды	32
Цитируемая литература	34
Глава 2. Стерилизация фильтрованием. Дж. Мульвани	37
Введение	37
Характеристики фильтрующих сред	38
Глубинное фильтрование	38
Фильтрование через сито	42
Мембранные фильтры	43
Контроль за качеством мембранных фильтров	46
Выбор системы фильтрования	50
Определение точки образования пузырьков	54
Работа с фильтровальным элементом	56
Установка фильтра в держателе	57
Автоклавирование	58
Очистка	59
Стерилизация жидкостей фильтрованием	59
1. Жидкости, которые фильтруются легко	59
2. Жидкости, требующие предварительной обработки	60
3. Жидкости, которые фильтруются трудно	63
Определение размера фильтрующего элемента	70
Стерилизация газа	71
Резюме	73
Цитируемая литература	73

Глава 3. Техника культивирования клеток в пластиковых панелях для микротитрования и ее применение в биологических исследованиях М. Розенбаум, Э. Сулливан и Э. Эдвардс	74
Введение	74
Микротитрование. Материалы и методика	76
А. Оборудование	76
Б. Калибровка петли	80
В. Разведение	81
Г. Микроскопы	82
Культивирование клеток	83
А. Среда	84
Б. Подготовка клеток	86
В. Оценка состояния культур	90
Применение клеточных культур, выращиваемых в микро-чашках	90
А. Вирусологическая техника	91
Б. Оценка результатов	97
В. Определение интерферона	101
Г. Торможение гемадсорбции	102
Д. Специальные цитологические методы	104
Е. Флуоресцирующие антитела	105
Ж. Электронная микроскопия	107
З. Использование микрометода в фармакологии	110
Потенциальные возможности метода	110
А. Иммунология	111
Б. Клонирование клеток	111
В. Автоматизация	111
Некоторые проблемы, связанные со спецификой микрометода	112
А. Неспецифическая токсичность	112
Б. Дефекты пластинок	113
В. Опасные последствия	113
Заключение	114
Цитируемая литература	114
Глава 4. Культура тканей в диагностической вирусологии. Д. Бертран	116
История вопроса	116
Диагностическая вирусологическая лаборатория	117
Оборудование и материалы	118
Культуральная среда	119
Выбор клеточных линий	120
Первичные и вторичные культуры клеток почки обезьяны	122
HeLa и другие перевиваемые линии клеток	125
Фибробласты	126
Культура амниона человека	129
Работа с клеточными культурами	129
Хранение в жидком азоте	130
Выделение и идентификация вирусов	132
Среда для переноса вирусного материала	132
Серологические исследования в тканевых культурах	136

Образование антигена	136
Заключение	138
Цитируемая литература	139
Глава 5. Культивирование макрофагов млекопитающих. <i>Дж. Уосли и Р. Джон</i>	140
Введение	140
Общая характеристика макрофагов	140
Макрофаги соединительной ткани	141
Макрофаги кровеносных и лимфатических синусоидов	143
Система макрофагов и ее функция	144
Макрофаги в культуре	144
Источники получения макрофагов для культивирования	148
Аппаратура и материалы	152
Общие замечания	152
Сосуды для культивирования	154
Среды для культивирования макрофагов	171
Методы получения и культивирования макрофагов	175
Материал из перитонеальной полости мыши	175
Перитонеальный диализат, взятый у человека	179
Материал из легкого кролика	181
Цитируемая литература	184
Глава 6. Хранение клеток при низкой температуре. Д. Мей	186
Введение	186
Теоретические основы	189
Влияние замораживания на биологические системы	191
Методы замораживания и оттаивания	192
Замораживание	192
Оттаивание	193
Хранение в газовой фазе	193
Фирмы, поставляющие приборы	194
Реактивы	195
Цитируемая литература	195
Глава 7. Культивирование фибробластов человека для исследования хромосом. Дж. Хаймэн и А. Полдинг	197
Введение	197
Общие требования к лаборатории и аппаратуре	198
Подготовка стеклянной посуды	200
Растворы и компоненты ростовых сред	201
Компоненты ростовых сред	203
Ростовые среды для первичных и перевиваемых культур	204
Кожа и другие источники фибробластов	205
Кожа	205
Другие источники	206
Метод однослойных культур	206
Получение первичных культур	206
Обработка монослоя для получения метафазных пластинок	210
Пересев клеток	210

Окрашивание хромосом в метафазных пластинках фибробластов	216
Анализ и фотографирование хромосом	218
Цитируемая литература	220
Глава 8. Применение метода флуоресцирующих антител к однослойным клеточным культурам. Ш. Хадсон	222
Введение	222
1. Прямой метод	223
2. Непрямой метод	224
Окрашивание комплементом	224
Флуоресцирующие соединения	225
Фотографирование	229
Неспецифическое окрашивание	229
Адсорбция конъюгата порошком печени	233
Приготовление порошка печени	233
Адсорбция	233
Окрашивание неспецифическими антителами сыворотки	234
Культуры клеток на покровных стеклах	236
Культуры клеток на предметных стеклах	237
Заражение вирусом клеточных культур на покровных стеклах	237
Фиксация	238
Резюме	239
Фирмы, поставляющие приборы и реактивы	239
Цитируемая литература	239
Глава 9. Культура зародышевых клеток из амниотической жидкости. Р. Полдинг	241
Введение	241
Цитология амниотической жидкости на 16-й неделе беременности	242
Типы клеток, обнаруженные в амниотической жидкости на 16-й неделе беременности	243
Методы культивирования	245
Метод А [13]	247
Метод Б [16]	248
Метод В [14] (модифицированный)	248
Цитируемая литература	251